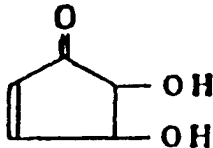




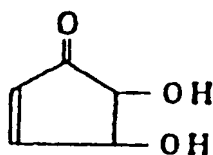
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C07C 49/707, 45/67, A01N 35/06, A23L 1/30, A61K 7/00, 7/50, 31/12</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/13328</p> <p>(43) 国際公開日 1998年4月2日(02.04.98)</p>									
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03052</p> <p>(22) 国際出願日 1997年9月1日(01.09.97)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平8/275231</td> <td>1996年9月27日(27.09.96)</td> </tr> <tr> <td>特願平8/325900</td> <td>1996年11月22日(22.11.96)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/55434</td> <td>1997年2月25日(25.02.97)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/92866</td> <td>1997年3月28日(28.03.97)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/116045</td> <td>1997年4月21日(21.04.97)</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</p> <p>小山信人(KOYAMA, Nobuto)(JP/JP) 佐川裕章(SAGAWA, Hiroaki)(JP/JP) 小林英二(KOBAYASHI, Eiji)(JP/JP) 榎 竜嗣(ENOKI, Tatsuji)(JP/JP) 務 華康(WU, Hua-Kang)(CN/JP) 西山英治(NISHIYAMA, Eiji)(JP/JP) 猪飼勝重(IKAI, Katsushige)(JP/JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒520-21 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)</p>	特願平8/275231	1996年9月27日(27.09.96)	特願平8/325900	1996年11月22日(22.11.96)	特願平9/55434	1997年2月25日(25.02.97)	特願平9/92866	1997年3月28日(28.03.97)	特願平9/116045	1997年4月21日(21.04.97)	<p>(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平8/275231	1996年9月27日(27.09.96)										
特願平8/325900	1996年11月22日(22.11.96)										
特願平9/55434	1997年2月25日(25.02.97)										
特願平9/92866	1997年3月28日(28.03.97)										
特願平9/116045	1997年4月21日(21.04.97)										
<p>(54) Title: CYCLOPENTENONES, PROCESS FOR PREPARING THE SAME, AND THE USE THEREOF</p> <p>(54) 発明の名称 シクロペンテノン類、その製造方法及び用途</p> <div style="text-align: center;">  <p>[1]</p> </div> <p>(57) Abstract</p> <p>A process for preparing 4,5-dihydroxy-2-cyclopenten-1-one represented by formula (1), characterized by heat-treating at least one member selected among: (a) uronic acids or uronic acid derivatives; (b) sugar compounds containing uronic acids and/or uronic acid derivatives; and (c) sugar compound-containing materials containing uronic acids and/or uronic acid derivatives.</p>											

(57) 要約

下記 (a)、(b)、(c) より選択される少なくとも1種の物を加熱処理することを特徴とする下記式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

- (a) ウロン酸又はウロン酸誘導体、
- (b) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、
- (c) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。



【1】

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロベニア
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SK	スロバキア
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	LV	ルカセニア	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MC	モナコ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TD	チュニジア
BG	ブルガリア	GW	ギニアビサウ	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ			TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TR	トルコ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IT	イタリア	NE	ニジェール	US	米国
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	KE	ケニア	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CN	中国	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KR	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ共和国	KZ	大韓民国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		

明 細 書

シクロペンテノン類、その製造方法及び用途

発明の属する技術分野

本発明は、制がん作用等の生理活性を有する安全性の高いシクロペンテノン類に関し、更に詳細には当該化合物の製造方法、該化合物を有効成分とする医薬品に関する。また本発明は食品、飲料等の分野で有用な一連の発明に関する。

従来技術

従来、臨床上の療法に用いられている薬物はアルキル化剤、代謝阻害剤、植物アルカロイド等の制がん剤、抗生物質、免疫促進剤、免疫調節剤など多岐にわたっているが、これらの薬物療法はいまだ完成したとは言いがたい。

これらのうち、天然物由来であるプロスタグランジンの中で、シクロペンテノン環を有するプロスタグランジンA及びJ類がDNA合成を抑制することにより、安全性の高い制がん剤としての可能性が報告され、それらの各種誘導体が合成されている（特開昭62-96438号公報参照）。

発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、制がん作用等の生理作用を有する安全性の高いシクロペンテノン化合物を開発し、該化合物の製造方法及び該化合物を有効成分とする制がん剤等の医薬品、該化合物を含有する食品又は飲料を提供することにある。また本発明の目的は該化合物の使用法、該化合物の関連化合物等を提供することにある。

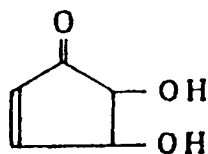
課題を解決するための手段

本発明を概説すれば本発明の第1の発明は、下記（a）、（b）、（c）より選択される少なくとも1種の物を加熱処理することを特徴とする下記式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法に関する。

【式1】

（b）ウロン酸及び、又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、

（c）ウロン酸及び、又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。



【 1 】

本発明の第2の発明は下記（a）、（b）、（c）より選択される少なくとも1種の物を加熱処理し、次いで該加熱処理物より式【1】で表される4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを採取することを特徴とする4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法に関する。

（a）ウロン酸又はウロン酸誘導体、

（b）ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、

（c）ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。

本発明の第3の発明は、下記工程を包含することを特徴とする4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの光学活性体の製造方法に関する。

（A）：（a）、（b）、（c）より選択される少なくとも1種の物を加熱処理し、4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを生成させる工程、

（a）ウロン酸又はウロン酸誘導体、

（b）ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、

（c）ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。

（B）：必要に応じて、得られた加熱処理物より4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを単離する工程、

（C）：4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを光学分割する工程。

本発明の第4の発明は、旋光度が $[\alpha]_D^{20} - 10.5^\circ$ （ ≤ 0.30 , エタノール）である（-）-4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンに関する。

本発明の第5の発明は、旋光度が $[\alpha]_D^{20} + 10.4^\circ$ （ ≤ 0.53 , エタノール）である（+）-4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンに関する。

ール)である(+) - 4, 5 - ジヒドロキシ - 2 - シクロペンテン - 1 - オンに関する。

本発明の第6の発明は、式【1】で表される4, 5 - ジヒドロキシ - 2 - シクロペンテン - 1 - オン及び／又はその光学活性体を含有することを特徴とする制がん剤に関する。

本発明の第7の発明は、式【1】で表される4, 5 - ジヒドロキシ - 2 - シクロペンテン - 1 - オン及び／又はその光学活性体を含有することを特徴とするがん細胞分化誘導剤に関する。

本発明の第8の発明は、式【1】で表される4, 5 - ジヒドロキシ - 2 - シクロペンテン - 1 - オン及び／又はその光学活性体を含有することを特徴とするアポトーシス誘発剤に関する。

本発明の第9の発明は、式【1】で表される4, 5 - ジヒドロキシ - 2 - シクロペンテン - 1 - オン及び／又はその光学活性体を含有することを特徴とする抗菌剤に関する。

本発明の第10の発明は、式【1】で表される4, 5 - ジヒドロキシ - 2 - シクロペンテン - 1 - オン及び／又はその光学活性体を有効成分として使用することを特徴とするがん細胞分化誘導方法に関する。

本発明の第11の発明は、式【1】で表される4, 5 - ジヒドロキシ - 2 - シクロペンテン - 1 - オン及び／又はその光学活性体を有効成分として使用することを特徴とするアポトーシス誘発方法に関する。

本発明の第12の発明は、式【1】で表される4, 5 - ジヒドロキシ - 2 - シクロペンテン - 1 - オン及び／又はその光学活性体を含有、希釈及び／又は添加してなることを特徴とする食品又は飲料に関する。

本発明の第13の発明は、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化

4, 5 - ジヒドロキシ - 2 - シクロペンテン - 1 - オンと反応性を有するアミン類、アミノ酸類、ペプチド類又は蛋白質の反応性の少なくとも一部が消失した及

び／又は該反応性物質の少なくとも一部が除去されたものであるウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物に関する。

本発明者らは式【1】で表される化合物、4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン（以下、単にシクロペンテノンと称す）がウロン酸、ウロン酸誘導体、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物から選択される少なくとも1種の物の加熱処理物中に生成し、加熱処理物中より単離された当該化合物が制がん作用、アポトーシス誘発作用、抗菌作用等の種々の生理活性を有することを見出し、当該化合物の光学活性体の創製にも成功し、本発明を完成させた。

図面の簡単な説明

図1はシクロペンテノンのマススペクトルを示す図である。

図2はシクロペンテノンの¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図3はアルギン酸加熱処理物より調整したシクロペンテノンのアポトーシス誘発作用を示す図である。

図4はシクロペンテノンのIR吸収スペクトルを示す図である。

図5はシクロペンテノンのUV吸収スペクトルを示す図である。

図6はシクロペンテノンの検量線を示す図である。

図7はグルクロン酸加熱処理物のガスクロマトグラフ結果を示す図である。

図8は保存時間とシクロペンテノン量の関係を示す図である。

図9は(-)-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの溶出曲線を示す図である。

図10は(+)-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの溶出曲線を示す図である。

図11は(-)-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図12は(+)-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図13は培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図である。

図 1 4 は培養時間と培養細胞中において成熟骨髄細胞の占める比率の関係を示す図である。

図 1 5 シクロペンテノンの制がん効果を示す図である。

発明の実施の形態

以下、本発明をより具体的に説明する。

本発明において、ウロン酸、ウロン酸誘導体、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物とは、その加熱処理物中にシクロペンテノンが生成されれば特に限定はない。

本発明により、食品又は飲料中に生理活性を有するシクロペンテノン及び／又はその光学活性体の適量を含むことが可能となった。これらの化合物が有する制がん作用、抗菌作用等によって、本発明の食品又は飲料は制がん性、抗菌性食品又は制がん性、抗菌性飲料として極めて有用である。

また本発明によりシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を含有する医薬用組成物が提供され、該医薬用組成物はがんの治療剤又は予防剤として、また防腐剤、抗菌性歯磨剤、抗菌性化粧料、抗菌性浴用剤等の抗菌剤として有用である。

更に本発明によりシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を有効成分として使用するがん細胞分化誘導方法、アポトーシス誘発方法が提供され、これらの方法は生化学研究や、がん細胞分化剤、アポトーシス誘発阻害剤等の医薬品のスクリーニングにおいて有用である。

本発明に使用されるシクロペンテノンは、(a) ウロン酸又はウロン酸誘導体、(b) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、(c) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物から選択される物を加熱処理することにより生成される。従って本発明は (a) (b) 又は (c) を含有し

る組成物を加熱処理することを要する。

(a)、(b) 又は (c) を加熱処理することにより、本発明のシクロペンテノンを得ることもできる。

また本発明においてはシクロペンテノンを含む加熱処理物、該加熱処理物からの部分精製シクロペンテノン及び精製シクロペンテノンを使用することができる。

ウロン酸はグリクロン酸ともいい、アルドースのアルデヒド基はそのままにして他端の第1アルコール基だけをカルボキシル基に酸化したヒドロキシアルデヒド酸の総称であり、天然では動植物の各種の多糖の構成成分として存在する。ウロン酸を含む多糖としては、ペクチン、ペクチン酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、フコイダン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸等があり、種々の生理機能が知られている。

本発明で 사용할 ことができるウロン酸は特に限定されるものでなく、例えばガラクトuron酸、グルクロン酸、グルロン酸、マンuron酸、イズロン酸等があり、ウロン酸の誘導体としては、それらのラクトン、それらのエステル、それらのアミド、それらの塩等があり、加熱処理によりシクロペンテノンを生成する物はすべて本発明の誘導体に包含される。ウロン酸のラクトンとしてはグルクロノ-6, 3-ラクトン（以下、グルクロノラクトンと略記する）、マンuron-6, 3-ラクトン、イズロノ-6, 3-ラクトン等が例示される。ウロン酸エステルとしては、例えばメチルエステル、エチルエステル、プロピレングリコールエステル、カルボキシメチルエステル等がありウロン酸より製造することができる。またウロン酸のアミド化によりウロン酸アミドも製造することができる。更にこれらの塩は常法により製造することができる。

次に本明細書において、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含む糖化合物は特に限定されるものでなく、例えばペクチン、ペクチン酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、フコイダン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸、それらの化学的、酵素的、物理的処理物である、その分解物、分解物の誘導体、分解物の塩を使用することができる。

前記の化学的な処理方法としては、原料化合物を例えば室温～200℃で数秒～数時間、好ましくは50～130℃で数秒～60分処理すれば良く、酸性下この処理を行うとグリコシド結合が加水分解を受け、ペクチンの場合、ガラクトッロ

ン酸及び／又はガラクトツロン酸エステルを含む分解物が生ずる。また例えばpH 6、8、9 5℃で数分～数十分処理することによりβ-脱離反応が生じ、235 nm付近の吸光度が増大した不飽和ウロン酸及び／又は不飽和ウロン酸エステルを有する糖化合物が得られる。本発明の糖化合物にはウロン酸及び／又はウロン酸エステルを含有する多糖類のβ-脱離反応により生成する非還元末端に不飽和ウロン酸及び／又は不飽和ウロン酸エステルを含有する糖化合物が含まれる。

また前記の酵素学的な処理方法としては、原料糖化合物のウロン酸及び／又はウロン酸エステル含有多糖加水分解酵素、例えばペクチナーゼ、ヒアルロニダーゼ等によるウロン酸及び／又はウロン酸エステル含有多糖の公知の分解が挙げられる。また、ウロン酸及び／又はウロン酸エステル含有多糖リアーゼによるウロン酸及び／又はウロン酸エステル含有多糖の公知の分解が挙げられる。例えばペクチン、ペクチン酸の場合、各々公知のペクチンリアーゼ（EC 4. 2. 2. 10）、ペクチン酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 2）、エキソポリガラクトツロン酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 9）で分解することによって、非還元末端に4-デオキシ-L-トレオ-ヘキス-4-エノピラノシル ウロネート（4-deoxy-L-threo-hex-4-enopyranosyl uronate）又はそのメチルエステルを有する糖化合物が得られる。また、ヒアルロン酸の場合はヒアルロン酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 1）、アルギン酸の場合はアルギン酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 3）が使用される。なお、アルギン酸の場合は非還元末端に4-デオキシ-L-エリトロ-ヘキス-4-エノピラノシル ウロネートを有する糖化合物が得られる。この非還元末端に4-デオキシ-L-トレオ-ヘキス-4-エノピラノシル ウロネート、4-デオキシ-L-エリトロ-ヘキス-4-エノピラノシル ウロネート又はそれらのメチルエステルを有する酵素分解物も本発明の糖化合物に包含される。

。

糖化合物の処理方法は、糖化合物の原料糖化合物のウロン酸及び／又はウロン酸エステル含有多糖加水分解酵素、例えばペクチナーゼ、ヒアルロニダーゼ等によるウロン酸及び／又はウロン酸エステル含有多糖の公知の分解が挙げられる。また、ウロン酸及び／又はウロン酸エステル含有多糖リアーゼによるウロン酸及び／又はウロン酸エステル含有多糖の公知の分解が挙げられる。例えばペクチン、ペクチン酸の場合、各々公知のペクチンリアーゼ（EC 4. 2. 2. 10）、ペクチン酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 2）、エキソポリガラクトツロン酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 9）で分解することによって、非還元末端に4-デオキシ-L-トレオ-ヘキス-4-エノピラノシル ウロネート（4-deoxy-L-threo-hex-4-enopyranosyl uronate）又はそのメチルエステルを有する糖化合物が得られる。また、ヒアルロン酸の場合はヒアルロン酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 1）、アルギン酸の場合はアルギン酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 3）が使用される。なお、アルギン酸の場合は非還元末端に4-デオキシ-L-エリトロ-ヘキス-4-エノピラノシル ウロネートを有する糖化合物が得られる。この非還元末端に4-デオキシ-L-トレオ-ヘキス-4-エノピラノシル ウロネート、4-デオキシ-L-エリトロ-ヘキス-4-エノピラノシル ウロネート又はそれらのメチルエステルを有する酵素分解物も本発明の糖化合物に包含される。

日中性又はアルカリ性の溶液中に入れ、温度は適宜、室温以上で、適宜還元下、例えばアスコルビン酸存在下で、時間は1秒以上、好ましくは5秒～1時間の超

音波処理をし、振動エネルギーを与えることが挙げられる。なお超音波以外にもマイクロ波、近赤外線、赤外線等の照射も有効で、これらを組合せ照射しても良い。照射は連続的に行っても良く、断続的に行っても良い。

本発明においてウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含む糖化合物含有物とは、上記のウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含む糖化合物の含有物であれば特に限定はない。ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含む糖化合物含有物としてはリンゴ、例えばミカン、レモン等の柑橘類、バナナ、白菜、キャベツ、レタス、シソ、カボチャ、セロリ、ゴボウ、エシャロット、ブロッコリー、ピーマン、ほうれん草、タマネギ、人参、人参の葉、大根の葉、茶、ゴマ、マメ、イモ等の双子葉類植物の果実、野菜、葉、種実等、麦、米等の单子葉植物の穀物、褐藻類、例えば昆布、ワカメ等、紅藻類、緑藻類、単細胞緑藻類等の藻類、微生物としてはリオフィラム、ウルマリウム、ハタケシメジ、ナメコ、シイタケ、エノキタケ、ヒラタケ、マッシュルーム等の担子菌類、サナギタケ、ノムシタケ等の子のう菌類、酵母、糸状菌、例えば麹菌、細菌、例えば納豆菌、乳酸菌等、動物としては脊椎動物又は無脊椎動物、ブタ皮膚、ウシ皮膚、サメ軟骨、鯨軟骨等が例示され、本発明においては、これらの植物、微生物又は動物由来のウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含む糖化合物含有物を使用することができる。

また本発明においては、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含む糖化合物含有物として、果物果皮、果物搾汁かす、例えばリンゴ搾汁かす、ミカン搾汁かす、野菜搾汁かす、穀類かす、例えば清酒粕、ビールかす、焼酎かす、ウイスキーかす、豆類かす、例えばおから、海藻かす等の農水産・食品加工処理物をそのまま、あるいは乾燥、粉碎して用いても良い。

本発明で使用するウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含む糖化合物含有物はそのまま、若しくは前処理として通常の、煮る、焼く、炒る、焙じる、煎じる、蒸す、炒める、揚げる等の任意の加工方法で処理することができる。

本発明においては、これらのウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含む糖化合物含有物を前記の化学的、酵素的（微生物による発酵を含む）、物理的前処

理を行って得られる該含有物の処理物、該処理物よりの精製物を使用しても良い。

ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物には、ウロン酸、ウロン酸誘導体、シクロペンテノンの生成中間体又はシクロペンテノンと反応性を有する物質、例えばアミン類、アミノ酸類、ペプチド類及び／又は蛋白質が含有されており、シクロペンテノンを製造するため好適にはこれらの反応性物質の反応性の少なくとも一部を消失させるための及び／又は該反応性物質の少なくとも一部を除去するための前処理を行うことが好ましい。該前処理方法に特に限定はないが、乾式加熱処理が好適であり、例えば上記のウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物の含有物の水分を除いたものを60～400℃で数秒から数日の加熱処理を行うことにより、本発明のシクロペンテノン、その光学活性体の製造に好適な、蛋白質等が不溶化、変性、若しくは不活性化されたウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物を得ることができる。乾式加熱処理の方法としては特開平2-79965号公報に記載の熱風を使用する焙炒処理方法があり、該方法により多量の加熱処理物、即ち焙炒処理物を効率よく調製することができる。焙炒処理物に特に限定はないが、焙炒植物、焙炒動物、焙炒微生物、例えば焙炒野菜、焙炒果実、焙炒穀物、焙炒きのこ、焙炒海藻、焙炒皮質、焙炒軟骨等が例示される。他の例としては該糖化合物含有物を蛋白質分解酵素処理した後、蛋白質分解物を除去した画分が挙げられる。また該糖化合物含有物の粉碎物の水洗物画分、該糖化合物含有物の酸で前処理した画分、該糖化合物含有物のアルカリで前処理した画分等が挙げられる。上記のように、シクロペンテノンの製造に好適であるシクロペンテノン生成性の前処理物は全て本発明で定義したウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物に包含される。

本発明のシクロペンテノンの生成中間体は、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体と反応性を有する物質とを含有する糖化合物含有物の加熱処理中に生成し、更に反応を行えばシクロペンテノンに変化する物質を意味する。シクロペンテノンの生成中間体としては、ウロ

ン酸の脱炭酸物、ウロン酸の脱水物、ウロン酸の脱炭酸・脱水物が例示される。

ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含む糖化合物である多糖類は公知の化学的、酵素学的、物理的な処理方法により製造することができる。例えばペクチンとしては、例えば柑橘類の果皮及びリンゴの果実より抽出される高分子の多糖類を使用することができる。工業的なペクチン製造の原料はフルーツで、レモン、ライム等の柑橘類のジュースのしぼりかす（主として内果皮）が用いられるほか、リンゴのジュースのしぼりかすも用いられている。ジュースのしぼりかすには主として不溶性のプロトペクチンが含まれており、製造の段階でこれを可溶化（抽出）し、ペクチンを調製する。可溶化は酸性の温水～熱水で抽出することによって行うことができ、抽出時の温度、pH、時間条件を原料に合わせてコントロールすることにより、分子量やエステル化度の一定なペクチンを高収量で製造することができる。抽出液は遠心分離やろ過によって精製し、濃縮後アルコールを添加してペクチンを沈殿させ回収することができる。回収された沈殿を乾燥、粉碎し、所定の乾燥ペクチンを調製することができる。

ペクチンの主構造は、部分的にメチル化されたガラクトツロン酸のポリマーである。カルボキシル基はメチルエステル化されたり、遊離の酸のままか、あるいはアンモニウム塩化、カリウム塩化、又はナトリウム塩化されている。ペクチンはメチルエステル化度（DM度：全カルボキシル基に対するメトキシル基の割合）によって、DM度の高いHMペクチン及びDM度の低いLMペクチンに分類され〔吉積智司ほか編、（株）光琳発行、新食品開発用素材便覧、第114～119頁（1991）〕、本発明においては市販の食品添加物ペクチン〔外山章夫編、食品と科学社発行、天然物便覧、第12版、第138頁（1993）〕、市販のHMペクチン、LMペクチン等（前出の新食品開発用素材便覧）を使用することができる。

合成法により合成されるウロン酸、ウロン酸誘導体、オリゴ糖等も本発明で使用するすることができる。

本発明に使用する加熱処理物は、（a）ウロン酸又はウロン酸誘導体、（b）ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含む糖化合物、（c）ウロン酸及び／

又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物から選択される物を原料として製造することができる。

本発明に使用する加熱処理物の製造における加熱処理方法としては、本発明のシクロペンテノンが生成する条件であれば特に限定は無いが、ウロン酸、ウロン酸誘導体、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、ウロン酸含有物及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物を例えば60～350℃で数秒～数日、好ましくは80～150℃で数分～数日加熱処理すれば良く、ペクチンの場合、例えば80～150℃で数分～数日の加熱処理を行うことにより、シクロペンテノンを含む加熱処理物を得ることができる。またウロン酸、ウロン酸のラクトン、ウロン酸エステルを60～150℃で数分～数日加熱処理することによりシクロペンテノンを含む目的の加熱処理物を得ることができる。これらの加熱処理物には4位と5位のヒドロキシル基がトランスの関係にあるトランスーシクロペンテノンとシスの関係にある微量のシスーシクロペンテノンが含まれている。この加熱処理物から精製したシクロペンテノンを実験例1)の無水ピリジン中で無水酢酸と反応させて得た4, 5-ジアセチルシクロペンテノンをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、核磁気共鳴法で各々の画分の構造解析を行うことにより、本加熱処理物中にトランスーシクロペンテノンと微量のシスーシクロペンテノンが含まれていることが確認できる。

加熱処理時のpHは特に限定はないが、中性から酸性下で行うのが好ましく、その原料に応じ加熱処理時のpHを調整すればよいが、通常は酸性下の加熱処理により、シクロペンテノンの生成が加速される。

加熱処理時の原料の濃度はその加熱処理によりシクロペンテノンを生じうる範囲内であれば特に限定は無く、操作性、収率等の点を考慮し設定すれば良い。

本発明における加熱処理は湿式加熱でも、乾式加熱でも良いが、本発明のシク

ロペンテノンの生成を促進するためには、湿式加熱よりも乾式加熱の方が好ましい。

乾式加熱としては、乾燥熱風による直接加熱法、熱源から隔壁を通して加熱する間接加熱法等が使用できる。直接加熱方法としては、気流乾熱法、噴霧乾

熱法等があり、間接加熱法としてはドラム乾熱法等が使用できる。

本発明に使用する加熱処理物中のシクロペンテノンには制がん作用、抗菌作用、アポトーシス誘発作用等を指標に採取することができる。採取手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製、単離手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂、順相、逆相の各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方法を組合せ、加熱処理物中に生成されたシクロペンテノンを選択することができる。

例えば、ウロン酸としてD-グルクロン酸を使用し、その1%溶液を121℃で4時間加熱処理することにより、加熱処理物中にシクロペンテノンが生成される。この加熱物中のシクロペンテノンを溶媒で抽出し、抽出物を濃縮する。次にこの濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、溶出するシクロペンテノン画分を濃縮し、濃縮物からシクロペンテノンをクロロホルムで抽出することにより、加熱処理物中のシクロペンテノンが単離される。

また上記グルクロン酸加熱処理物をイオン交換樹脂カラム、好ましくは陰イオン交換樹脂カラム処理し、非吸着性画分を集めることによりシクロペンテノンが精製される。あるいは上記グルクロン酸加熱物を活性炭カラム処理し、非吸着画分の除去、カラムの洗浄を行った後、親水性有機溶媒、例えばエタノール水溶液、好ましくは40%以上のエタノール水溶液で溶出することにより、精製シクロペンテノンを得ることができる。またこれらの方法を組み合わせることにより、高純度のシクロペンテノンを得ることができる。

単離されたシクロペンテノンを光学分割することにより、本発明の(−)-4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン及び(+)-4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンを得ることができる。当然、合成方法により得られたシクロペンテノンも本発明により光学分割することができる。

光学活性体の分離はラセミ混合物の機械的分割、優先晶出法、ジアステレオマー塩あるいは包接化合物としての結晶化による分割、酵素・微生物による動力学的分割、クロマトグラフィーによる分割等により行うことができる。

クロマトグラフィーによる分離としては、ガスクロマトグラフィー、液体クロ

マトグラフィ、薄層クロマトグラフィー等を用いることができ、それぞれに適したキラル固定相を使用すればよい。

液体クロマトグラフィーによる光学分割としてはキラルな固定相を用いる方法、キラルな溶離液を用いる方法、ジアステレオマーとしての分離等を用いることができる。

キラル固定相としてはアミド系固定相、尿素系固定相、配位子交換型固定相、多糖・多糖誘導体固定相、タンパク質固定相、ポリメタクリル酸エステル固定相、ポリメタクリルアミド固定相等が使用できる。

溶離液としてはヘキサン系、アルコール系、水（緩衝液）系等が使用でき、上記固定相との組合せにおいて適宜使用することができる。

本発明で使用するシクロペンテノンの製造方法はいかなる方法でも良く、本発明で開示の方法で製造しても良く、化学合成法〔カーボハイドレートリサーチ（Carbohydrate Res.）、第247巻、第217～222頁（1993）、ヘルベチカ キミカ アクタ（Helvetica Chimica Acta）、第55巻、第2838～2844頁（1972）〕で合成しても良く、シクロペンテノンのトランス体、シス体が本発明に使用される。当然、化学合成法で得られたシクロペンテノンの光学活性体も本発明の光学活性体に包含される。またウロン酸、ウロン酸誘導体、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物から選択される少なくとも1種の物の加熱処理物中に生成するシクロペンテン、その精製物、その光学活性体も使用することもできる。

シクロペンテン及びその光学活性体は、例えばヒト前骨髄性白血病細胞HL-60、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞MOLT-3、肺がん細胞A-549、SV40形質転換肺細胞WI-38VA13、肝がん細胞Hep G2、結腸がん細胞HCT-116、ヒト結腸がん細胞SW480、ヒト結腸がん細胞W303

がん活性を有し、シクロペンテン及びその光学活性体は制がん剤の有効成分として使用することができる。また、これらのがん細胞にアポトーシス誘発作用を

有する。本発明のシクロペンテノン及びその光学活性体のがん細胞増殖抑制作用機作は本発明をなんら制限するものではないが、例えばがん細胞に対するアポトーシス誘発作用も本発明に包含される。

制がん作用を有するシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば制がん剤を製造することができる。制がん剤の製造は一般的には、シクロペンテノン及び／又はその光学活性体を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分であるシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

本発明の制がん剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

制がん剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有されるシクロペンテノン及び／又はその光学活性体の量が成人1

日当り $0.1 \mu\text{g} \sim 200 \text{mg} / \text{kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

シクロペンテノン及び／又はその光学活性体は制がん作用を有するが、低濃度ではがん細胞の分化誘導能を有し、シクロペンテノン及び／又はその光学活性体はがん細胞の分化誘導剤（脱がん剤）としても有用である。シクロペンテノン及び／又はその光学活性体を有効成分とするがん細胞分化誘導剤は、上記制がん剤に準じ、製剤化することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。

がん細胞分化誘導剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有されるシクロペンテノン及び／又はその光学活性体の量が成人1日当り $0.1 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明のがん細胞分化誘導剤はがん細胞分化誘導方法に使用することができる。すなわちシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を有効成分として使用することによりがん細胞を分化させることができ、該方法はがん細胞の分化誘導機構の解明、分化誘導剤のスクリーニング等に有用である。

本発明の抗菌剤はシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば本発明の抗菌剤を製造することができる。当該製剤の製造は一般的には、シクロペンテノン及び／又はその光学

（錠剤）、（散剤）、（顆粒剤）、（粉砕剤）、（カプセル剤）、（液剤）、（懸濁剤）、（乳剤）

加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加に

よって液状となし得る乾燥品とすることができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分であるシクロペンテノン及び／又はそれらの光学活性体を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

本発明の抗菌剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

抗菌剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有されるシクロペンテノン及び／又はその光学活性体の量が成人1日当たり $10\mu\text{g} \sim 20\text{mg}/\text{kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。またシクロペンテノン及び／又はその光学活性体含有物を抗菌性飲食品の原料として用いても良い。またエタノール、グリシン、酢酸ナトリウム、アスコルビン酸、グリセリン脂肪酸エステル、食塩、EDTA等の他の抗菌性物質と組合せて使用しても良い。

本発明の抗菌剤はシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を有効成分とし、食品又は飲料の保存性を向上させる防腐剤として使用することができる。また、シクロペンテノン及び／又はその光学活性体を食品又は飲料に添加し、食品又

は飲料を防腐する方法に使用することができる。

食品又は飲料に添加する場合のシクロペンテノン及び／又はその光学活性体含有抗菌剤の形状は、液状、ペースト状、粉末状、フレーク状、顆粒状等いずれの形状でも良い。取り扱いやすさや、他の添加物と混合して使用することも考えれば、乾燥して粉末状、フレーク状、顆粒状にすることが好ましい。乾燥方法としては、通常の乾燥方法、例えばスプレー乾燥、ドラム乾燥、棚式乾燥、真空乾燥、凍結乾燥などで行うことができる。

シクロペンテノン及び／又はその光学活性体の食品又は飲料への添加量は食品又は飲料の種類により異なり、その目的に応じた量を添加すれば良い。

本発明の抗菌剤の使用方法として、食品又は飲料に適当な方法で添加する方法が行われる。添加する方法は特に制限はなく、要するに何らかの方法でシクロペンテノン及び／又はその光学活性体が食品又は飲料に含有されれば良い。したがって、本発明の抗菌剤の使用において、添加とはシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を食品又は飲料中に含有させるいかなる方法も含む。通常の方法は食品又は飲料の製造工程中に添加するが、シクロペンテノン及び／又はその光学活性体を含有する溶液に食品を一定時間浸漬する方法も用いることができる。更にまた、食品中に添加する方法と浸漬方法を併用することもできる。浸漬方法に適する食品としては、水中でも形くずれしない食品、例えば、蒲鉾、ウイナソーセージ等の魚畜肉練り製品、ゆで麺等の麺類、冷凍前の海老、貝、魚類等の冷凍食品などを挙げることができる。

本発明の抗菌剤を防腐剤として用いることにより、食品又は飲料の保存性を一段と向上させることができる。また冷凍食品や冷蔵等においては、冷凍前の加工工程において、汚染した微生物の増殖を抑制することができ、衛生上極めて好ましい結果を得ることができる。本発明の抗菌剤はグラム陽性細菌、グラム陰性細菌、

レウス、下痢型のバチルス・セレウス、腸出血性大腸菌O-157等の食中毒菌に極めて有効である。更に真菌にも有効である。また細菌起因性疾病の起因菌

、例えば在郷軍人病の起因菌のレジオネラ ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、食中毒起因菌のビブリオ パラハエモリチカス (*Vibrio parahaemolyticus*)、潰瘍起因菌のヘリコバクター ピロリ (*Helicobacter pylori*)、胃腸炎起因菌のキャンピロバクター ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) 等、例えば *Legionella pneumophila* (ATCC 33153)、*Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802)、*Helicobacter pylori* (NCTC 11637)、*Campylobacter jejuni* (ATCC 29428) 等に抗菌作用を有し、また、酵母、カビ等の微生物にも有効である。特に天然食品由来のシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を含有する防腐剤は天然由来の食中毒予防剤、除菌剤として有用性が高い。なお本発明の抗菌剤を用い、衣服、敷布等の殺菌を行うことができ、本発明の抗菌剤を散布すること、本発明の抗菌剤での拭き取り等により、目的物の除菌、殺菌を行うことができる。例えばビルの冷房用水に添加することにより、在郷軍人病の予防を行うことができる。

本発明の抗菌剤は虫歯菌や歯周病菌にも抗菌活性を示し、本発明の抗菌剤を含有する口内用剤を提供することができる。口内用剤の形状は液状、ペースト状等の公知の形状とすることができる。口内用剤としては歯磨剤が例示される。歯磨剤としては液状でもよく、またペースト状、粉末状でもよく、公知の歯磨剤の形状とすることができる。歯磨剤中のシクロペンテノン及び／又はその光学活性体の歯磨剤中の含有量は特に制限されず、虫歯菌や歯周病菌に対する有効濃度が含有されていればよい。歯磨剤中には公知の添加剤、例えば湿潤剤、界面活性剤、結合剤、香料、甘味料等を添加すればよい。本発明の歯磨剤の有効成分としてはシクロペンテノン含有物、例えば野菜、果物等の加熱処理物も使用でき、これらのシクロペンテノン含有の加熱処理物を含有する口内用剤、例えば歯磨剤も本発明に包含される。

本発明の抗菌剤を使用することにより抗菌性化粧料を提供することができる。本発明の化粧料としては有効量のシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を

含有するクリーム、乳液、ローション、洗顔料、パック等の基礎化粧料、口紅、ファンデーション等のメイクアップ化粧料、ボディソープ、石鹸等の形態に調製することができる。また、頭髮に対しても有効であり、ヘアートニック、ヘアーリキッド、ヘアーセットローション、ヘアーブロー剤、ヘアークリーム、ヘアークート等のヘアー製品やシャンプー、リンス、ヘアートリートメント等の頭髮用トイレタリー等のヘアーケア製品の形態にすることができる。化粧料への配合量としては通常化粧料100部（重量部、以下同様）中のシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を約 10^{-3} ～10部、好ましくは 10^{-2} ～1部とすれば良い。化粧料の他の成分は通常化粧料に配合されるものを使用できる。本発明の化粧料はアトピー性皮膚炎の起因菌にも有効に作用し、アトピー性皮膚炎の改善、予防にも著効を有する。

本発明の抗菌剤を使用することにより浴用剤を提供することができる。本発明の浴用剤としては有効量のシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を含有する粉末浴用剤、顆粒浴用剤、固形浴用剤、液状浴用剤等の形態に調製することができる。浴用剤への配合量としては通常浴用剤100部（重量部、以下同様）中のシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を約10～100部、好ましくは20～90部とすれば良く、かくして調製される本発明の浴用剤は、湯200リットルに対し通常5～25グラム添加すれば良い。浴用剤の他の成分は通常浴用剤に配合されるものを使用できる。本発明の浴用剤はアトピー性皮膚炎の起因菌にも有効に作用し、アトピー性皮膚炎の改善、予防にも著効を有する。また浴場からの病因菌の駆除にも有効である。

以上、本発明により、医薬、化粧料、浴用剤として有用な抗菌剤が提供される。またシクロペンテノン等を含有する食品又は飲料は食中毒、胃腸炎等の改善及び／又は予防に極めて有用である。

本発明のアボトシス誘発剤は、アボトシス誘発性を有するシクロペンテノン及びその光学活性体を含む。本発明のアボトシス誘発剤は、錠剤、散剤、注射剤、点眼剤、点鼻剤、吸入剤、外用剤等の形態に調製することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。

アボトシス誘発剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及

びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有されるシクロペンテノン及び／又はその光学活性体の量が成人1日当り0.1 μ g \sim 100mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

なおアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死であると考えられている。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化され、この遺伝子を基にプログラム死遺伝子タンパク質が生合成され、生成したプログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。

本発明のアポトーシス誘発剤は、このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現させることができ、不要若しくは病原細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて有用なものである。

本発明のアポトーシス誘発剤はアポトーシス誘発方法に使用することができる。すなわちシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を有効成分として使用することによりアポトーシスを誘発させることができ、該方法はアポトーシス誘発機構の解明、アポトーシス誘発剤、アポトーシス誘発阻害剤のスクリーニング等に有用である。

本発明の抗菌性食品又は飲料とは、特に限定はないが、例えば穀物加工品（小麦粉加工品、でんぷん類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅等）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシング等）、大豆加工品（豆腐類、味噌、納豆等）、食肉加工品（ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージ等）、水産製品（冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮等）、乳製品（原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリーム等）、野菜・果実加工品（ペースト類、ジャム類、漬け物類

ン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、(c) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物から選択される物の加熱処理物へ添加し、該加熱処理物中のシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を希釈してもよい。

次に食品又は飲料の製造においては、任意の工程で、加熱処理を行い、加熱処理物中にシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を含有させれば良く、シクロペンテノン及び／又はその光学活性体を含有する加熱処理物を添加してもよい。また食品又は飲料やその原料をシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を含有する加熱処理物へ添加し、該加熱処理物中のシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を希釈してもよい。また、添加は1回又は数回に渡って行ってもよい。したがって、簡便に新規な生理作用を示す食品又は飲料を製造することができる。また製造時において(a) ウロン酸又はウロン酸誘導体、(b) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、(c) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物から選択される物を含有せしめ、製造時において生成した加熱処理物中のシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を構成成分とする食品又は飲料も本発明に包含される。いずれの工程を経た場合も、シクロペンテノン及び／又はその光学活性体を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は本発明の食品又は飲料と定義される。

生理作用を有するシクロペンテノン及び／又はその光学活性体の食品中の含有量は特に制限されず、その官能と制がん性、抗菌性等の生理活性の点より適宜選択できるが、例えばシクロペンテノン及び／又はその光学活性体の含有量は食品100部当り 5×10^{-6} 部以上、食品としての官能、生理作用の面からは好ましくは $10^{-5} \sim 5$ 部、更に好ましくは $10^{-4} \sim 2$ 部である。

また、生理作用を有するシクロペンテノンの飲料中の含有量は特に制限されず、その官能と制がん性、抗菌性等の生理活性の点より適宜選択できるが、例えばシクロペンテノンの含有量は飲料100部当り 5×10^{-6} 部以上、飲料としての官能、生理作用の面からは好ましくは $10^{-5} \sim 5$ 部、更に好ましくは $10^{-4} \sim 2$ 部である。

本発明の食品又は飲料としては、制がん性、抗菌性等の生理作用を有するシクロペンテノン及び／又はその光学活性体が含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

以上、本発明に使用するシクロペンテノン及びその光学活性体は、安価に製造でき、その種々の生理的機能により、食品又は飲料の添加剤として使用することにより、食品又は飲料に簡便に種々の生理的機能、抗菌力、アポトーシス誘発作用、制がん作用等を付与することができ、本発明のシクロペンテノン及びその光学活性体は食品又は飲料への添加剤として極めて有用である。

本発明に使用するシクロペンテノン及びその光学活性体の製造方法はいかなる方法でも良く、本発明で開示の方法で製造しても良く、化学合成方法で合成しても良い。すなわち、シクロペンテノン及び／又はその光学活性体を含有する食品又は飲料、抗菌剤、制がん剤、がん細胞分化誘導剤、アポトーシス誘発剤はすべて本発明に包含される。またシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を有効成分として使用するがん細胞分化誘導方法及びアポトーシス誘発方法はすべて本発明に包含される。

本発明のシクロペンテノン及びその光学活性体は100mg/kgの経口投与でマウスに毒性は認められない。

以上、シクロペンテノン及びその光学活性体は、安価に簡便に製造でき、その種々の生理的機能により、医薬、食品等の広い分野において極めて有用な化合物である。

実施例

本発明を以下の実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%及び部は特記しない限り重量比である。

実施例1

材料

(1) 市販のリンゴ製ペクチンを1%になるように水に溶解し、還流冷却器を取り付けたナス型フラスコに入れて110～120℃に設定した油浴中18時間

、42時間、及び66時間加熱した。加熱中のペクチン溶液の温度は100～102℃であった。

上記ペクチン溶液を遠心して沈殿を除き、その上清を3倍及び10倍に水で希釈した試料を調製した。次に該加熱処理物をNaOHでpH7.0に調整した後、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60細胞(ATCC CCL-240)に対する細胞増殖抑制作用を以下に記載のMTT法で測定した。

すなわち希釈した試料10 μ lと56℃、30分間処理した牛胎児血清(ギブコ社製)を10%含むRPMI 1640培地(日水社製)にて37℃で培養した5000個のHL-60細胞を含むRPMI 1640培地100 μ lを96穴マイクロタイタープレートのウェルに添加し、5%炭酸ガス存在下37℃で48時間培養後、5mg/mlの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT;シグマ社製)リン酸緩衝食塩水溶液10 μ lを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04N HCl含有2-プロピルアルコール100 μ lを加えて良く攪拌し、590nmにおける吸光度を測定してこれを細胞増殖度とした。

その結果、18時間加熱ペクチンの3倍希釈液添加区分、42時間及び66時間加熱ペクチンの3倍、10倍希釈液添加区分において生細胞は観察されず、これらの希釈液濃度において100℃加熱ペクチンは細胞増殖抑制活性を示した。

一方、18時間加熱ペクチンの10倍希釈液添加区分ではほぼすべての細胞が生細胞であったが、対照の水添加区分と比べて590nmにおける吸光度は低かった。

(2) 100℃で18～66時間加熱したペクチン200 μ lに200 μ lのメタノールを加えて混合後遠心を行い、上清200 μ lを減圧下濃縮乾固した。これを10 μ lの50%メタノール水溶液に溶解し、1 μ lをシリカゲル60シートF(メルク社製)にスポットした後、展開溶媒(酢酸ブチル:酢酸蒸:蒸留水=3:1:1の上層)で展開した。展開し終えた薄層シリカゲルを乾燥後、AgNO₃-NH₃溶液(0.1M AgNO₃と5N NH₃の等量混合物)を噴

霧し、加熱することにより、スポットを検出した。その結果、R_f値約0.3付近のスポットが18時間加熱したペクチンで現れ、42時間加熱したペクチンでは18時間加熱したペクチンよりも増加しており、66時間加熱したペクチンでは42時間加熱したペクチンと同程度の量であった。

(3) 実施例1-(1)記載の100℃で66時間加熱したペクチン1mlにメタノール1mlを加えて混合し、遠心によって上清を得た。この上清を減圧下濃縮乾固し、100μlのメタノールに懸濁した。この懸濁液を遠心して不溶物を除き、上清をシリカゲル60シートF₂₅₄にスポットし、実施例1-(2)に記載の溶媒で展開した。薄層の一部を切り取って実施例1-(2)に記載の方法で発色させてR_f値約0.3付近のスポットが出現することを確認し、このR_f値に相当する部分のシリカゲルを未発色の薄層からかき取った。

かき取ったシリカゲルから1mlのメタノールで3回抽出し、減圧下濃縮乾固してR_f値約0.3付近のスポットを単離した。この乾固物を250μlの水に溶解し、更に水で10倍に希釈した液10μlを試料として実施例1-(1)記載のMTT法でHL-60細胞に対する細胞増殖抑制活性を測定した。

その結果、水を添加したウェルではほとんどの細胞が生育していたのに対して本希釈液を添加したウェルでは生細胞が見られなかった。すなわち、このかき取り区分のがん細胞増殖抑制作用を確認した。

(4) 実施例1-(3)で単離したR_f値約0.3付近のがん細胞増殖抑制物質の質量分析をDX302質量分析計(日本電子社製)を用いて行った。また、重クロロホルム溶媒を用いて核磁気共鳴法(NMR)によって構造を解析した。核磁気共鳴装置はJNM-A500(日本電子社製)を用いた。その結果を以下に示す。

FAB-MS m/z 115 [M+H]⁺

δ 4.20 (1H, d, J=2.4 Hz, 5-H)、4.83 (1H, m, 4-H)、6.30 (1H, dd, J=1.2, 6.1 Hz, 2-H) 7.48

(1H, dd, J = 2.1, 6.1 Hz, 3-H)

但し、¹H-NMRの化学シフト値はCHCl₃の化学シフト値を7.26 ppmとして表した。

これらの値はアハマド (T. Ahmad) ら [カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Res.) 第247巻、第217-222頁 (1993)] が報告しているトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンの数値と一致した。

図1にそのマスのスペクトルを示し、その縦軸は相対強度(%)、横軸はm/z値を示す。

図2にその¹H-NMRスペクトルを示し、その縦軸はシグナルの強度、横軸は化学シフト値(ppm)を示す。

実施例 2

(1) 25gのアルギン酸(非膨潤性、和光純薬社製)を475mlの水に懸濁し、121℃で2時間加熱した後、遠心によって得た上清を0.22μmのメンブレンフィルターでろ過し、ろ液を20mlになるまで減圧下濃縮した。これに180mlのエタノールを加えて混合後、-20℃で1時間放置し、遠心によって上清を得た。この上清を減圧下20mlまで濃縮し、180mlのアセトニトリルを加えた後、遠心によって得た上清を減圧下20mlまで濃縮し、再び180mlのアセトニトリルを加えて遠心し、その上清を減圧下15mlまで濃縮した。4mlの上記濃縮液を減圧下約400μlまで濃縮した後、酢酸ブチル：酢酸：水=3：2：2混合液の上層を等量加えて攪拌して遠心上清を集めるという操作を繰り返し、8mlの抽出液を得た。

4mlの上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲルBW-300SP(2x28cm、富士シリシア化学社製)にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水=3：2：2の上層を溶離液としてコンプレッサーで0.18kg/cmに加圧し、毎分約5mlの流速で分離を行った。1画分当り6~7mlになるようにフラクショネーションを行い、各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところ31番から35番までの画分に高純度のシクロペンテノンが含ま

れており、35 mg のシクロペンテノンを得た。

この画分をパルパックタイプSカラムを用いた順相HPLCで分離し、215 nmの紫外吸収で検出したところ、純度は95.8%であった。

(2) 実施例2-(1)で調製したシクロペンテノンを用い、2.86 mM、955 μ M、318 μ M、106 μ M、35 μ M、12 μ M、及び0.18 μ Mのシクロペンテノン水溶液を調製した。次に該加熱処理物をNaOHでpH7.0に調整した後、HL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を次のように測定した。

56℃、30分間処理した牛胎児血清を10%含むRPMI 1640培地にて37℃で培養したHL-60細胞を10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地にて 5.8×10^4 個/1.35 mlとなるように懸濁した。

この懸濁液1.35 mlに対し、前記シクロペンテノン溶液を0.15 ml添加し、37℃、5%二酸化炭素存在下で20時間培養した。

その結果、培養20時間後において106 μ M以上のシクロペンテノンを添加した区分(終濃度10.6 μ M)では生細胞数及び細胞生残率の低下が見られ、35 μ M シクロペンテノンを添加した区分(終濃度3.5 μ M)ではアポトーシス誘発によるDNAの低分子化と細胞形状の変化(核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成)が見られた。

その結果を図3に示す。すなわち図3はHL-60細胞の培養液に様々な濃度のシクロペンテノンを添加したときの培養時間と生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸は培養液中の生細胞数($\times 10^4$ 個/1.5 ml)を示す。

図3中において白四角印(□)は試料無添加(対照)、白ひし形印(◇)は2.86 mM シクロペンテノン添加区分、白丸印(○)は955 μ M シクロペンテノン添加区分、白三角印(△)は318 μ M シクロペンテノン添加区分、

35 μ M シクロペンテノン添加区分、黒丸印(●)は12 μ M シクロペンテノン添加区分をそれぞれ示す。

実施例 3

(1) 10 g のD-グルクロン酸 (シグマ社製 G 5269) を1リットルの水に溶解し、121℃で4時間加熱した後約10 ml になるまで減圧下濃縮した。これに酢酸ブチル：酢酸：水=3：2：2 混合液の上層40 ml を加えて混合後、遠心によって得た上清を減圧下約10 ml まで濃縮した。

上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲルBW-300SP (2×28 cm、富士シリシア化学社製) にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水=3：2：2 の上層を溶離液としてコンプレッサーで0.2 kg/cm² に加圧し、毎分5 ml の流速で分離を行った。1画分当り10 ml になるようにフラクショネーションを行い、各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところ61番から80番までの画分に高純度のシクロペンテノンが含まれていた。これらの画分を集めて減圧下濃縮した後40 ml のクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧下濃縮することによって100 mg のシクロペンテノンを得た。

この画分をパルパックタイプSカラムを用いた順相HPLCで分離し、215 nmの紫外吸収で検出したところ、純度は98%であった。

(2) 上記シクロペンテノンの質量分析をDX302質量分析計を用いて行った。また、重クロロホルム溶媒を用いたNMRによって構造を解析した。核磁気共鳴装置はJNM-A500を用いた。比旋光度はDIP-370型旋光計 (日本分光社製)、UV吸収スペクトルはUV-2500分光光度計 (島津製作所社製)、赤外吸収スペクトル (IR) はFTIR-8000赤外分光光度計 (島津製作所社製) をそれぞれ用いた。質量分析、NMRは実施例1-(4) と同一の結果であった。他の結果を示す。

旋光度： $[\alpha]_D^{20}$ 0° (c 1.3, 水)

IR (KBr法)：3400、1715、1630、1115、1060、1025 cm⁻¹ に吸収を有する。

UV： λ_{max} 215 nm (水)

図4にそのIRスペクトルを示し、その横軸は波数 (cm⁻¹)、縦軸は透過率を示す。

図5にそのUV吸収スペクトルを示し、その横軸は波長（nm）、縦軸は吸光度を示す。

実施例 4

1%のD-グルクロン酸（シグマ社製 G 5269）水溶液を121℃で4時間加熱し、1N NaOHでpHを7に調整した。5mlの本試料を水で平衡化したハイトラップQカラム（5ml；ファルマシア社製）にアプライし、25mlの水でカラムを洗浄した。最初にカラムから溶出してきた5mlをP0画分、2番目に溶出してきた5mlをP1画分、3番目に溶出してきた10mlをP2画分、最後に溶出してきた10mlをP3画分とした。次に25mlの0.5M酢酸で溶出を行った。最初にカラムから溶出してきた5mlをE0画分、2番目に溶出してきた5mlをE1画分、3番目に溶出してきた5mlをE2画分、最後に溶出してきた10mlをE3画分とした。

各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところシクロペンテノン（P1画分に含まれており、本画分に定量的に回収されていた。ハイトラップQカラムで精製する前に含まれていた未反応のグルクロン酸と反応生成物であるレダクチン酸はP1画分には見られなかった。

実施例 5

（1）実施例3-（1）記載のシクロペンテノン精製標品を0.67 mg/mlとなるように水に溶解した。また、n-オクタコサン（ナカライテスク社製）を1 mg/mlとなるようにn-ヘキサン（ナカライテスク社製）に溶解した。チューブ5本に対して、n-オクタコサン溶液は100 μ l（100 μ g）ずつ、シクロペンテノン水溶液は各々15 μ l（10 μ g）、45 μ l（30 μ g）、90 μ l（60 μ g）、135 μ l（90 μ g）、180 μ l（120 μ g）加えた。各々のチューブを減圧下乾燥し、トリメチルシリル化溶液[N,O-ビス（トリメチルシリル）-アセトアミド（ナカライテスク社製）とトリメチルクロロシリラン（バーゼルサイエンス社製）の1:1混合物]

2.1 mm \times 3.2 mm ϕ のガラスカラム（島津社製）に2% OV17 Uniport HP 60/80

mesh（ジーエルサイエンス社製）を充てんしたものを、ガスクロマトグラフ装置 GC-7AG（島津社製）によりキャリアーガス N_2 で 20 ml/分の流速で 15 時間空焼きを行った。

このガスクロマトグラフシステムで、上記各トリメチルシリル化試料を 1 μ l アプライした。分析条件は以下に示すとおりである。

キャリアーガス： N_2

流速：50 ml/分

注入口温度：280 $^{\circ}C$

初期温度：80 $^{\circ}C$ 、4 分

昇温：8 $^{\circ}C$ /分

最終温度：270 $^{\circ}C$

検出：水素炎イオン化検出装置

この結果、シクロペンテノン保持時間およそ 9.7 分のところに、n-オクタコサンは保持時間およそ 26.7 分のところに単一でピークが検出できた。このときに得られた各ピークの面積は以下に示すとおりである。

シクロペン テノン量	シクロペンテノン のピーク面積(a)	n-オクタコサンの ピーク面積(b)	(a)/(b)
10 μ g	19,981	285,798	0.06991
30 μ g	90,980	285,398	0.3188
60 μ g	174,284	251,439	0.6931
90 μ g	272,524	256,356	1.063
120 μ g	368,573	255,545	1.442

このようにして得られたシクロペンテノン量に対するシクロペンテノンのピーク面積 (a) / n-オクタコサンのピーク面積 (b) をグラフに表すと図 6 のように表される。すなわち図 6 はシクロペンテノンの検量線を示す図であり、縦軸はシクロペンテノンのピーク面積と n-オクタコサンのピーク面積の比を、横軸はシクロペンテノン量 (μ g) を示す。

すなわちシクロペンテノン量が未知の試料に対して n-オクタコサンを 100 μ g

加え減圧下乾燥後、トリメチルシリル化し、上記方法に従いガスクロマトグラフで分析して、シクロペンテノンのピーク面積／*n*-オクタコサンのピーク面積の値(y)を求めることにより、シクロペンテノン量が定量できる。

(2) 1% (重量%) の濃度に調製したグルクロン酸 (ナカライテスク社製) 水溶液を120℃、4時間オートクレーブで加圧加熱した。これを100 μ l (グルクロン酸1mg相当) チューブにとり*n*-オクタコサンを100 μ g 加え減圧下乾燥後、トリメチルシリル化した。これを上記方法に従い、ガスクロマトグラフで分析したところ図7に示すようなパターンが得られた。すなわち図7はグルクロン酸加熱処理物のガスクロマトグラフ結果を示す図であり、縦軸は検出強度を示し、横軸は保持時間(分)を示す。シクロペンテノンは保持時間およそ10.2分〔ピーク(a)〕のところに、*n*-オクタコサンは保持時間およそ27.8分〔ピーク(b)〕のところに単一でピークが検出される。

この結果、以下に示すとおりとなり、グルクロン酸の加熱処理によるシクロペンテノンへの変換率はモル換算で約15%となった。

シクロペンテノンのピーク面積(a) : 203,794

n-オクタコサンのピーク面積(b) : 305,444

(a) / (b) : 0.6672

シクロペンテノン量(μ g) : 88.4

実施例 6

市販のグルクロノラクトン (メルク社製 code No. 100282) を1%になるように水に溶解し、121℃で0.5時間、1時間、2時間、4時間、又は16時間加熱した。本加熱処理液を上記実施例5-(1)記載の方法に従ってトリメチルシリル化し、ガスクロマトグラフで分析した。

分析結果を以下に示す。

Figure 7

0.5

9.28

1.43

1

21.0

3.26

2	52.8	8.15
4	119	18.3
16	132	20.4

この結果、グルクロノラクトンの加熱処理によるシクロペンテノンへの変換率は加熱16時間処理においてモル換算で約20%であった。

また実施例3-(1)に記載の方法に準じ、上記グルクロノラクトンの16時間加熱処理液より精製シクロペンテノンを得た。

実施例 7

市販のキャベツ100gに100mlの水を加え、ミキサーで粉砕した。5mlのプロテイナーゼK(20mg/ml; 宝酒造社製、9033)を添加して50℃で1時間反応させた後、ろ過してその残渣を1.5リットルの水で洗浄した。洗浄した残渣に100mlの水を加えてpH6.5の懸濁液を得、これを121℃で2時間加熱した後、ろ過することによりpH4.7のろ液を得た。このろ液を減圧下14mlまで濃縮し、36mlのメタノールを添加して混合後、4000×gで10分間遠心して上清を得た。この上清を減圧下濃縮して3.5mlの濃縮液を得た。

この濃縮液100μl中に含まれるシクロペンテノン量を実施例5-(1)に記載の方法で測定したところ、24.9μgであった。ミキサーによる粉砕後、プロテイナーゼK処理と水洗による除タンパク処理を行わず、そのまま加熱した場合にはシクロペンテノンの生成が認められなかった。このことから、100gのキャベツをプロテイナーゼK処理と水洗による除タンパク後に、上記条件で加熱することにより0.87mgのシクロペンテノンが生成していることが明らかになった。

次に実施例3-(1)の方法に準じてこの濃縮液からシクロペンテノンを精製、単離した。

実施例 8

(1) ペクチン(リンゴ製、和光純薬社製)の1%水溶液8mlに1.36単位、0.68単位、又は0.14単位のペクチナーゼ(8.1単位/mg蛋白、

シグマ社製、P 9 9 3 2) を加え、2 5℃で1 晩放置した。これらの①酵素反応物、及び②酵素反応物の遠心上清、にH C lを加えてp H 3に調製した後1 2 1℃で4 時間加熱して加熱処理物を得た。加熱処理物中に含まれるシクロペンテノンを実施例5-(1)記載の方法に従ってトリメチルシリル化し、加熱処理物中のシクロペンテノン量をガスクロマトグラフで測定した。

その結果を表1に示す。

表 1

ペクチナーゼ添加量 (単位/8 0 m g ペクチン)	変換率 (%、重量換算)	
	①	②
1 . 3 6	4 . 4 6	4 . 7 5
0 . 6 8	4 . 5 2	4 . 6 2
0 . 1 4	3 . 3 9	3 . 4 3
0	2 . 7 1	2 . 7 3

この結果、ペクチンをペクチナーゼ処理によって加水分解してから加熱処理を行った場合、加熱処理のみを行った場合に比べてシクロペンテノン生成量は2 5～7 5 %上昇した。

(2) 1 g のアルギン酸 (非膨潤性 ; 和光純薬社製) を1 0 0 m l の①0 . 1 N H C l 又は②0 . 1 M N a ₂ C O ₃ に懸濁又は溶解し、9 5℃で1 5 時間加熱した後、①には粉末N a ₂ C O ₃、②には6 N H C l を加えてp H を2 . 7 に調整した。一方、③1 g のアルギン酸を1 0 0 m l の水に懸濁したもの (p H 約 7 . 5) を、④1 g のアルギン酸を1 0 0 m l の水に懸濁したもの (p H 約 7 . 5) に、①0 . 1 N H C l 又は②0 . 1 M N a ₂ C O ₃ に懸濁又は溶解し、9 5℃で1 5 時間加熱した後、①には粉末N a ₂ C O ₃、②には6 N H C l を加えてp H を2 . 7 に調整した。

試験

試験

で4 時間加熱したもの (試料①～試料④と呼ぶ) に含まれるシクロペンテノン量を以下の方法で測定した。

試料①～試料④に含まれる不溶物を遠心分離によって除き、上清10 μ lをTSK gel G2000PWカラム(7.5 mm \times 30 cm; 東ソー社製)を用いたゲルろ過HPLCによって分析した。なお、移動相は水、流速は1 ml/分、カラム温度は40 $^{\circ}$ Cとし、215 nmにおける吸光度で検出した。標準物質としては実施例3-(1)記載の精製シクロペンテノンを用い、内部標準物質として2-シクロペンテン-1-オン(アルドリッチ社)を用いた。

その結果、試料①には414 μ g/ml、試料②には279 μ g/ml、試料③には289 μ g/ml、試料④には296 μ g/mlのシクロペンテノンが含まれていることが明らかになった。すなわち、121 $^{\circ}$ Cで4時間加熱した試料③に比べて、121 $^{\circ}$ C、4時間加熱の前に0.1N HCl中で95 $^{\circ}$ C、15時間加熱した場合に1.43倍のシクロペンテノンが生成した。

各試料より、実施例3-(1)記載の方法で精製シクロペンテノンを調製した。

(3) 市販の50 gのおからに120 mlの水を加えて室温で2時間振とうし、遠心分離とろ過によって固形物を除いた。50 mlのろ液に1N H₂SO₄を加えてpH2に調整し、121 $^{\circ}$ Cで4時間加熱して試料⑤を得た。

100 gのおからに300 mlのアセトンを加えて攪拌し、ろ過によって55 gの残渣を得た。27.5 gの残渣を1リットルの水で洗浄し、水を加えて150 mlとした後、1N H₂SO₄を加えてpH2に調整し、121 $^{\circ}$ Cで4時間加熱して試料⑥を得た。

アセトン処理の残渣の残り27.5 gを200 mlの水に懸濁し、プロテイナーゼK(20 mg/ml、宝酒造社製)500 μ lを加えて50 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。反応物を1リットルの水で洗浄し、水を加えて180 mlとした後、1N H₂SO₄を加えてpH2に調整し、121 $^{\circ}$ Cで4時間加熱して試料⑦を得た。

試料⑤～⑦をろ過して得たろ液を減圧下約10 mlまで濃縮して4倍量のアセトンを加え、遠心して上清を得た。これらの上清を更に減圧下濃縮し、試料⑤からは5.5 ml、試料⑥からは3.8 ml、試料⑦からは3.0 mlの濃縮液を得

た。これらの濃縮液に含まれるシクロペンテノン量を実施例 8 - (2) 記載の方法で測定した。

その結果、いずれも 50 g のおからから出発して、試料⑤では 0.54 mg、試料⑥では 2.79 mg、試料⑦では 3.98 mg のシクロペンテノンが生成していた。また、試料⑤～⑦調製途中の 121℃、4 時間加熱前の試料のいずれにもシクロペンテノンは含まれなかった。従ってプロテイナーゼ処理によって除タンパクすることにより、シクロペンテノン生成量は約 40% 増加した。

試料⑤～⑦の各試料より、実施例 3 - (1) 記載の方法で精製シクロペンテノンを調製した。

50 g のおからを 200 ml の水に懸濁し、6N HCl で pH 1.5 に調整した後、50℃で 3 時間加熱した。NaOH で pH 5.0 に調整し、ろ過によってろ液を得た。このろ液を 6N HCl で pH 2.05 に調整し、121℃で 4 時間加熱した。これを試料⑧とする。試料⑧に含まれるシクロペンテノン量を実施例 8 - (2) 記載の方法で測定した。

その結果、50 g のおからから 5.0 mg のシクロペンテノンが生成していた。なお 121℃、4 時間加熱前の濾液にはシクロペンテノンは含まれなかった。

(4) 市販のアップルファイバー（乾燥粉末、ニチロ社製）に以下の処理を行った。

アップルファイバー 0.5 g を 50 ml の水に懸濁し、121℃で 4 時間加熱した。遠心によって 37 ml の上清を得た。これを試料⑨とする。

アップルファイバー 5 g を 50 ml の水に懸濁し、121℃で 4 時間加熱した。遠心によって 20 ml の上清を得た。これを試料(10)とする。

アップルファイバー 5 g を 50 ml の水に懸濁して室温で 2 時間振とうし、その遠心上清を 121℃で 4 時間加熱した。遠心によって 25 ml の上清を得た。

試料(11) 試料⑨に、アップルファイバー 0.5 g を加えて、50 ml の水に懸濁し、121℃で 4 時間加熱した。遠心によって 31 ml の上清を得た。これを試料(12)とする。

試料⑨～(12)に含まれるシクロペンテノン量を実施例 8 - (2) 記載の方法で測定した。

その結果、試料⑨には $14.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、試料(10)には $76.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、試料(11)には $54.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、試料(12)には $34.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロペンテノンが含まれていた。また、試料⑨の 121°C 、4 時間加熱前の試料にはシクロペンテノンは含まれていなかった。したがって、アップルファイバー 1 g から、試料⑨の製造方法では 1.09 mg 、試料(10)の製造方法では 0.305 mg 、試料(11)の製造方法では 0.270 mg 、試料(12)の製造方法では 0.212 mg のシクロペンテノンが生成した。

試料⑨～(12)の各試料より、実施例 3 - (1) 記載の方法により精製シクロペンテノンを調製した。

実施例 9

市販の煎茶の葉、焙じ茶の葉、烏竜茶の葉、又は紅茶の葉 2 g に 100 ml の水を加えてミキサーで粉碎し、 1 N 硫酸で $\text{pH} 3$ に調整し、 121°C で 16 時間加熱した。これらの加熱処理物に含まれるシクロペンテノン量を実施例 8 - (2) に記載のゲル濾過 HPLC 法によって測定した。この結果、煎茶からは 0.19 mM 、焙じ茶からは 0.28 mM 、烏竜茶からは 0.34 mM 、紅茶からは 0.12 mM のシクロペンテノンが生成していた。これらの原料はその製造過程において乾式加熱処理を受けており、シクロペンテノンが効率よく生成した。

実施例 10

ペクチン（和光純薬工業株式会社製 code 167-00542）、アルギン酸（非膨潤性：和光純薬工業株式会社製 code 011-13341）、D- α -ガラクトuron酸（ナカライテスク社製 code 165-18）、及びD-グルクロン酸（ナカライテスク社製 code 169-28）をそれぞれ 1 % になるように蒸留水に溶解し、各溶液を調製した。更に、ペクチンは、 1 N 酢酸水溶液に溶解した溶液も調製した。

ペクチンの 1 % 水溶液の pH は $\text{pH} 3.4$ であった。ペクチンの 1 % 酢酸溶液の pH は $\text{pH} 2.6$ であった。ガラクトuron酸水溶液の加熱前の pH は $\text{pH} 2.5$ であった。グルクロン酸水溶液の加熱前の pH は $\text{pH} 2.4$ であった。アルギ

ン酸水溶液の加熱前のpHはpH3.3であった。

次に、これらの1%溶解液を121℃で2、4、16時間の加熱処理を行い、各々の加熱処理物をNaOHでpH7に調整した後、0.22 μ mのフィルター滅菌を行い、シクロペンテノン生成量測定試料を調製した。

シクロペンテノンはシリカゲルシート60F₂₅₄（メルク社製）上にスポットした後、展開溶媒（酢酸ブチル：酢酸：蒸留水＝3：1：1の上層）で展開し、展開し終えた薄層シリカゲルを乾燥後、AgNO₃ - NH₃ 溶液（0.1M AgNO₃ と5N NH₃ の等量混合物）を噴霧し、加熱することにより、R_f値約0.3付近のスポットとして検出される。

上記シクロペンテノン生成量測定試料の2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍希釈液を調製し、その希釈液のTLCを上記の方法で行った。なお、ペクチンの1%水溶液の2時間加熱処理物の2倍希釈物のシクロペンテノンの生成量を1単位とし、各加熱処理物のシクロペンテノン生成量を測定した。その結果を表2に示す。

各試料において加熱時間の増加とともにシクロペンテノンの生成量の増加が認められ、ガラクトロン酸水溶液の加熱処理物においては30分後に1単位、1時間後には5単位、グルクロン酸水溶液の加熱処理物においては3分後に5単位、1時間後に10単位のシクロペンテノンの生成が認められた。

表 2

加熱試料	加熱時間	加熱前pH	加熱後pH	調整後pH	シクロペンテ ノン生成単位
ペクチン 1 % 水溶液	2 時間	3.4	3.3	7.0	1
	4 時間	3.4	3.2	7.2	5
	1 6 時間	3.4	3.5	7.0	1 0
ペクチン 1 % 酢酸溶液	2 時間	2.6	2.7	7.0	1
	4 時間	2.6	2.6	7.2	2
	1 6 時間	2.6	2.8	7.1	1 0
ガラクトロン 酸 1 % 水溶液	2 時間	2.5	2.4	6.9	1 0
	4 時間	2.5	2.4	6.8	2 5
	1 6 時間	2.5	2.6	6.9	5 0
グルクロン酸 1 % 水溶液	2 時間	2.4	2.7	6.9	2 5
	4 時間	2.4	2.6	7.0	5 0
	1 6 時間	2.4	2.8	7.0	5 0
アルギン酸 1 % 水溶液	2 時間	3.3	2.5	6.9	5
	4 時間	3.3	2.7	7.0	5
	1 6 時間	3.3	2.9	7.3	1 0

実施例 11

(1) 市販のグルクロノラクトン（メルク社製 code No. 100282）を1%になるように水に溶解し、121℃で0.5時間、1時間、2時間、4時間、又は16時間加熱した。本加熱処理液を実施例5-(1)記載の方法に従ってトリメチルシリル化し、生成するシクロペンテノン量をガスクロマトグラフで分析した。

測定結果を表3に示す。

表 3

加熱時間 (時間)	シクロペンテノン量 ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	変換率 (%、モル換算)
0.5	9.28	1.43
1	21.0	3.26
2	52.8	8.15
4	119	18.3
16	132	20.4

この結果、グルクロノラクトンの加熱処理によるシクロペンテノンへの変換率は加熱16時間処理においてモル換算で約20%であった。

また上記実施例3-(1)記載の方法に準じ、上記グルクロノラクトンの16時間加熱処理液よりシクロペンテノンを精製、単離した。

(2) 市販のグルクロノラクトン（メルク社製 code No. 100282）を1%になるように水に溶解し、121℃で0.5時間、1時間、2時間、4時間、又は16時間加熱した。本加熱処理液を実施例5-(1)記載の方法に従ってトリメチルシリル化し、生成するシクロペンテノン量をガスクロマトグラフで測定した。

1) 記載の方法に従ってトリメチルシリル化し、生成するシクロペンテノン量をガスクロマトグラフで測定した。

測定結果を表 4 に示す。

表 4

グルクロノラクトン濃度 (%)	シクロペンテノン量 ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	変換率 (%、モル換算)
0.1	15.1	23.2
1	99.2	15.3
3	229	11.8
5	365	11.3
10	455	7.03
20	592	4.58

この結果、グルクロノラクトンの加熱処理によるシクロペンテノンへの変換率は 0.1% グルクロノラクトン水溶液を用いた場合、モル換算で約 23% であった。

(3) 上記グルクロノラクトンの 1% 水溶液の pH を HCl 又は NaOH で pH 1、2、3、又は 4.5 に調整し、121℃ で 4 時間加熱した。本加熱処理液を実施例 5-(1) 記載の方法に従ってトリメチルシリル化し、生成するシクロペンテノン量をガスクロマトグラフで測定した。

測定結果を表 5 に示す。

表 5

p H	シクロペンテノン量 (μ g / 100 μ l)	変換率 (%、モル換算)
1	7. 8 5	1. 2 1
2	1 5. 9	2. 4 6
3	1 0 8	1 6. 7
4. 5	1 2 5	1 9. 3

この結果、グルクロノラクトンの加熱処理によるシクロペンテノンへの変換率はp H 4. 5の場合、モル換算で約19%であった。

(4) 1%ガラクトツロン酸水溶液のp HをH C l又はN a O Hで1、2、3、4、5、6、又は7に調整し、121℃で4時間加熱した。本加熱処理液を実施例5-(1)記載の方法に従ってトリメチルシリル化し、生成するシクロペンテノン量をガスクロマトグラフで測定した。

測定結果を表6に示す。

表 6

p H	シクロペンテノン量 (μ g / 100 μ l)	変換率 (%、モル換算)
1	16.6	2.83
2	66.6	11.3
3	42.7	7.27
4	7.36	1.25
5	5.47	0.931
6	5.45	0.927
7	0	0

この結果、ガラクトロン酸の加熱処理によるシクロペンテノンへの変換率はpH 2の場合、モル換算で約11%であった。

(5) アルギン酸（非膨潤性）の1%水懸濁液のpHをHCl又はNaOHで1、2、3、又は4に調整した。また、アルギン酸（非膨潤性）を1%濃度で0.1M酢酸緩衝液に溶解してpH 5に調整したもの、0.1Mリン酸緩衝液に溶解してpH 6又は7に調整したものを作製した。これらを121℃で4時間加熱した。本加熱液に含まれるシクロペンテノン量を以下に示す条件のゲル濾過HPLC法によって測定した。

カラム：TSK gel α -2500 (7.8×800mm：東ソー社製)

カラム温度：40℃

移動相：0.01%トリフルオロ酢酸水溶液

流速：1ml/分

検出：215nmにおける吸光度

実施例3-(1)で調製した精製シクロペンテノンを標準物質として、10.

0分付近に溶出されてくるシクロペンテノンのピーク面積を測定することによりシクロペンテノン濃度を決定した。

その結果を表 7 に示す。

表 7

p H	加熱処理後 p H	シクロペンテノン濃度 (mM)	変換率 (%、重量換算)
1	1. 0 7	0	0
2	1. 9 8	0. 5 3 6	0. 6 1 1
3	2. 7 6	2. 0 0	2. 2 8
4	4. 0 1	1. 0 5	1. 2 0
5	5. 0 2	0. 1 6 7	0. 1 9 0
6	5. 9 5	0	0
7	6. 9 0	0	0

この結果、アルギン酸（非膨潤性）の加熱処理によるシクロペンテノンへの変換率は pH 3 の場合、約 2.3% であった。

实施例 12

ポモシンペクチンタイプLM-13CG（ハーキュリーズ社製）、アルギニックアシッドHFD（大日本製薬社製）、D-グルクロン酸（ナカライテスク社製）及びグルクロノラクトン（メルク社製）を1%となるように水に溶解又は懸濁

1997年12月25日 星期一 晴

ルシリル化し、加熱処理物中のシクロペンテノン生成量をガスクロマトグラフで測定した。その結果を表 8 に示す。

表 8

ウロン酸化合物	加熱温度 (°C)	シクロペンテノン生成量 (μ g/ml)
ペクチン	1 2 1	1 7 6
	1 3 2	1 2 8
アルギン酸	1 2 1	4 6 6
	1 3 2	7 5
グルクロン酸	9 5	3 0 2
	1 2 1	7 1 8
	1 3 2	1 3 2
グルクロノ ラクトン	9 5	2 7 4
	1 2 1	7 8 1
	1 3 2	1 6 1

実施例 13

(1) コンドロイチン硫酸A (生化学工業社製)、コンドロイチン (ナトリウム塩、生化学工業社製)、デルマタン硫酸 (ナトリウム塩、セルビオ社製)、ヘパリン (ナトリウム塩、和光純薬社製)、又はヒアルロン酸 (生化学工業社製) を1%になるように水に溶解し、1N HClでpH3に調整した。これらを121°Cで4時間又は16時間加熱することによって加熱処理液を調製した。

(2) 実施例13-(1)で調製したコンドロイチン硫酸A、コンドロイチン、デルマタン硫酸、またはヘパリンの各加熱処理液100 μ lをn-オクタコサ

ン（ナカライテスク社製）のn-ヘキサン（ナカライテスク社製）溶液（1 mg / ml）100 μ l と混合し、減圧下乾燥した。これに100 μ l の上記トリメチルシリル化溶液を加えて完全に溶解し、実施例5 - （1）記載の方法で加熱処理物中のシクロペンテノン量を分析した。

その結果を表9に示す。

表 9

	100 μ l 中のシクロペンテノン量 (μ g)	
	4 時間加熱 処理液	16 時間加熱 処理液
コンドロイチン硫酸 A	9. 26	15. 71
コンドロイチン	7. 47	9. 11
デルマタン硫酸	32. 81	47. 60
ヘパリン	5. 09	5. 12

（3）100 μ l のヒアルロン酸加熱液を減圧下乾燥した後、10 μ l のメタノールに懸濁し、遠心によって不溶物を除いた。遠心上清1 μ l をシリカゲルシート60 F₂₅₄（メルク社製）にスポットして酢酸ブチル：酢酸：水＝3：2：2の上層を展開溶媒として薄層クロマトグラフィー（TLC）を行った。展開後、オルシノールー硫酸法によって発色させ、シクロペンテノン標準物質のスポットと比較し、その結果、4時間加熱処理液と16時間加熱処理液とを比較すると、

実施例 14

デルマタン硫酸1 gを100 mlの水に溶解して1N HClでpH3に調整

し、121℃で16時間加熱し加熱処理液を調製した。次に実施例3-(1)の方法に準じて加熱処理物よりシクロペンテノンの精製を行い、30mgの精製シクロペンテノンを得た。

実施例 15

(1) 実施例3-(1)記載の精製、単離シクロペンテノンを水、10mM トリス (T r i s) -HCl (pH7)、又は10mM トリス (pH10) に25mMになるように溶解し、室温又は4℃で放置した後、実施例13-(3)記載のTLC法で分析した。その結果、水又は10mM トリス-HCl (pH7) に溶解した場合、室温放置、4℃放置ともに1ヵ月経過後において若干の分解物が見られたが大部分は未分解であった。10mM トリス (pH10) に溶解した場合は室温で速やかに分解し、溶解直後にTLC法で分析したところシクロペンテノンのスポットは見られなかった。

水に溶解したシクロペンテノンを121℃で30分間加熱し、TLC法で分析したところ、若干の分解物は見られたが大部分のシクロペンテノンは未分解であった。

(2) 1%D-グルクロン酸水溶液を121℃で4時間加熱し、pH未調整の試料とNaOHでpH6.6に調整した試料を調製した。各々を1mlずつ分注し、-20℃、4℃、37℃で保存した後、シクロペンテノンを実施例5-(1)記載の方法に従ってトリメチルシリル化し、試料中のシクロペンテノン量をガスクロマトグラフで測定した。

その結果、25日間保存後では、37℃で保存した場合にシクロペンテノン量がやや減少していたが、4℃、-20℃ではほぼ安定であった。その結果を図8に示す。すなわち図8は保存時間とシクロペンテノン量の関係を示す図であり、横軸は保存時間(日)、縦軸はシクロペンテノン濃度(mg/ml)を示す。図8中において白四角印(□)はpH未調整で-20℃保存、黒四角印(■)はpH6.6で-20℃保存、白丸印(○)はpH未調整で4℃保存、黒丸印(●)はpH6.6で4℃保存、白三角印(△)はpH未調整で37℃保存、黒三角印(▲)はpH6.6で37℃保存を示す。

実施例 16

(1) 実施例 3 - (1) 記載の精製、単離シクロペンテノン 113.9 mg をエタノール 2.85 ml に溶かした。このエタノール溶液にヘキサン/エタノール (94/6) 3.85 ml を更に加え、17 mg/ml のシクロペンテノン溶液を調製した。この液を 0.5 μ m のフィルターでろ過し、光学分割 HPLC 試料溶液とした。

この試料溶液を以下の条件で光学分割 HPLC を行い、前ピークのシクロペンテノン及び後ピークのシクロペンテノンのフラクションをそれぞれ集め、減圧乾固し、前ピークのシクロペンテノン 43.2 mg、後ピークのシクロペンテノン 43.0 mg をそれぞれ得た。

光学分割 HPLC 条件

カラム：キラルパック AS (ダイセル化学工業) 2.0 cm \times 25.0 cm

カラム温度：40°C

移動相：ヘキサン/エタノール (94/6)

流速：14.0 ml/min

検出：UV 210 nm

試料注入量：150 μ l (2.55 mg)

得られた前ピークのシクロペンテノン及び後ピークのシクロペンテノンは両者共に約 1 % のエナンチオマーを含有していたため再度上記の条件で光学分割した。その結果、前ピークのシクロペンテノン 30.0 mg から 19.7 mg のエナンチオマーを含有しないシクロペンテノンを、後ピークのシクロペンテノン 37.4 mg から 27.7 mg のエナンチオマーを含有しない後ピークのシクロペンテノンをそれぞれ得た。得られた前ピークのシクロペンテノン及び後ピークのシクロペンテノンの旋光度はそれぞれ $[\alpha]_D^{20} - 105^\circ$ (c 0.30、エタノール) 及び $[\alpha]_D^{20} + 104^\circ$ (c 0.53、エタノール) であり、前ピーク物質が (−) −トランス−4,

シクロペンテン−1−オン〔以下 (−) 体シクロペンテノンと称す〕であった。なお旋光度は前記の DIP-370 型旋光計 (日本分光社製) を用いて測定した。

。

(-) 体シクロペンテノン及び (+) 体シクロペンテノンの光学分割 HPLC の溶出曲線を図 9、図 10 に示す。すなわち図 9 は (-) 体シクロペンテノンの溶出曲線であり、図 9 中、縦軸は吸光度、横軸は溶出時間 (分) を示す。また、図 10 は (+) 体シクロペンテノンの溶出曲線であり、図 10 中、縦軸は吸光度、横軸は溶出時間 (分) を示す。

次に (-) 体シクロペンテノン及び (+) 体シクロペンテノンのそれぞれの質量分析、核磁気共鳴法 (NMR) による構造解析、UV 吸収スペクトルの測定、赤外吸収スペクトルの測定を実施例 3-(2) に記載の方法に準じ行った。その結果、両光学活性体は光学分割前のシクロペンテノンと同一の結果を示した。

図 11 に (-) 体シクロペンテノンの ^1H -NMR スペクトルを示す。図 11 中その縦軸はシグナルの強度、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。

図 12 に (+) 体シクロペンテノンの ^1H -NMR スペクトルを示す。図 12 中その縦軸はシグナルの強度、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。

(2) 前出カーボハイドレートリサーチ記載の方法により、トランス-シクロペンテノンを合成した。また前出ヘルベチカ キミカ アクタ記載の方法に従いシス-シクロペンテノンを合成した。また光学分割法により各々の光学活性体を調製した。

調製した (+) -トランス-シクロペンテノン、(-) -トランス-シクロペンテノン、(+)-シス-シクロペンテノン、(-)-シス-シクロペンテノンにつき各実施例に記載の方法で細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性、がん細胞分化誘導活性、抗菌活性を測定したところ、(+)-トランス-シクロペンテノン、(-)-トランス-シクロペンテノン、(+)-シス-シクロペンテノン、(-)-シス-シクロペンテノンは各々細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性、がん細胞分化誘導活性、抗菌活性を示した。

実施例 17

実施例 16 で得た (-) 体シクロペンテノンと (+) 体シクロペンテノンのそれぞれの 1 mg/ml エタノール溶液を 75% エタノール水溶液で 2 倍、4 倍、

8倍、16倍、32倍、64倍、128倍、256倍、512倍、1024倍及び2048倍に希釈し、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに5 μ lずつ入れて風乾した。5000個のヒト前骨髄性白血病細胞HL-60 (ATCC CCL-240) 細胞を含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地100 μ lを各ウェルに加え、5%炭酸ガス存在下37℃で48時間培養した。細胞の形態を光学顕微鏡で観察した後、5 mg/mlの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT; シグマ社製)リン酸緩衝食塩水溶液10 μ lを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04N HCl含有2-プロパノール100 μ lを加えて良く攪拌し、590 nmにおける吸光度を測定してこれを細胞増殖度とした。

その結果、シクロペンテノンの光学活性体の各128倍希釈液添加区分(終濃度0.39 μ g/ml)においても細胞増殖抑制活性が見られ、またアポトーシス誘発作用が見られた。

実施例 18

(1) 1×10^5 /mlのHL-60細胞を含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地に10、1、0.1、又は0.01 μ g/mlのシクロペンテノンを添加し、5%炭酸ガス存在下37℃で3日間及び6日間培養した後、生細胞数を計数した。その結果、培養6日目においてシクロペンテノンを添加しない対照に比べて10 μ g/ml添加区分では生細胞は見られず、1 μ g/ml添加区分では約90%、0.1 μ g/ml添加区分では約55%、0.01 μ g/ml添加区分では約40%の細胞増殖阻害が見られた。

その結果を図13に示す。すなわち図13はHL-60細胞の培養液にシクロペンテノンを様々な濃度で添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図である。横軸は培養時間(日)、縦軸は培養液中の生細胞数(個/ml)を示す。

(○)は10 μ g/ml、白丸印(●)は1 μ g/ml、白三角印(△)は0.1 μ g/ml、黒四角印(■)は0.01 μ g/mlのシクロペンテノン添加を

それぞれ示す。

(2) HL-60細胞に $10^{-4} \mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロペンテノン添加して実施例15-(1)と同様に3日間培養した。細胞の一部をとってスライドガラスに塗抹し、「組織培養の技術」(日本組織培養学会編、朝倉書店、1982年)第191頁に記載のライトーギムザ染色を行い、光学顕微鏡で観察した。その結果、シクロペンテノン無添加の対照では分化した細胞が10%前後であったのに対してシクロペンテノン添加区分では50%以上の細胞が単球又はマクロファージ様細胞に分化していた。

(3) HL-60細胞に $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 又は $0.005 \mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロペンテノン添加して実施例18-(1)と同様に3日間又は6日間培養した。細胞の一部をとってスライドガラスに塗抹後、ライトーギムザ染色を行い、光学顕微鏡で観察した。その結果、シクロペンテノン無添加の対照では分化して形態の変化した細胞が約10%であったのに対して、シクロペンテノン $0.005 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加区分では25%以上の細胞が分化して成熟骨髄細胞になっていた。その結果を図14に示す。すなわち図14は培養時間と、培養細胞中において成熟骨髄細胞の占める比率の関係を示す図であり、横軸は培養時間(日)、縦軸は培養細胞中において成熟骨髄細胞の占める比率(%)を示す。図14において白四角印(□)は試料無添加(対照)、白丸印(○)は $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ シクロペンテノン添加、白三角印(△)は $0.005 \mu\text{g}/\text{ml}$ シクロペンテノン添加をそれぞれ示す。

実施例 19

(1) 実施例3-(1)記載の精製、単離シクロペンテノンの抗菌作用を以下の菌株で測定した。測定に使用した菌株は被検菌(1):サルモネラ エンテリティディス(*Salmonella enteritidis*) (食中毒事例株)、被検菌(2):サルモネラ ティフィムリウム(*Salmonella typhimurium*) (食中毒事例株)、被検菌(3):スタフィロコッカス アウレウス(*Staphylococcus aureus*) FR1 722 (A型エンテロトキシン産生株)、被検菌(4):*Staphylococcus aur*

eus (メチシリン耐性株)、被検菌(5) : バチルス セレウス (*Bacillus cereus*) (嘔吐型食中毒事例株) 及び被検菌(6) : *Bacillus cereus* (下痢型食中毒事例株) である。これらの菌株はいずれも女子栄養大学・衛生学教室保存菌株である。

抗菌作用の測定は、各被検菌に対する増殖抑制効果を指標に行った。すなわち、一定濃度のシクロペンテノンを含む菌体培地に各被検菌を一定量添加した試験菌液を調製し、16hr、48hr培養後の生菌数を比較することにより行った。

まず、感受性測定ブイヨン(日水製)に、一定濃度のシクロペンテノンを加え、2"連続希釈を行った。それに感受性測定ブイヨンで37℃16時間前培養を行った菌液を10⁶/mlになるように接種し、37℃で培養を行った。各菌株の各培養時間ごとの生菌数の測定は、培養液を適宜希釈し表面塗抹培養法により行った。なお、それぞれの菌株の菌数測定に当っては*Salmonella*はDHL(栄研製)、*S. aureus*はBaird Parker agar(BL製)、*B. cereus*はNGKG agar(日水製)を使用した。なお、*B. cereus*のみは32℃で培養を行った。各培養時間での測定した菌数は、CFU(colony forming units)/mlとして常用対数値で表示した。下記表10に培養16時間後の被検菌数、表11に培養48時間後の被検菌数を示す。シクロペンテノンはいずれの被検菌にも抗菌作用を示した。なお以下、表10~13において表中の-記号は、被検菌の生育が見られなかったことを意味する。

表 1 0

被検菌培養液中 添加試料濃度 (ppm)	1 6 時間培養後の被検菌数 (CFU/ml)					
	被検菌					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1563	-	-	-	-	-	-
781	-	-	-	-	-	-
391	-	-	6.1	-	-	-
195	3.0	3.0>	4.9	4.3	-	-
98	5.2	5.0	4.7	5.5	5.8	3.0
49	7.0	6.7	6.9	6.1	6.9	6.8
0	8.8	8.3	8.7	8.4	8.4	7.8

表 1 1

被検菌培養液中 添加試料濃度 (ppm)	4 8 時間培養後の被検菌数 (CFU/ml)					
	被検菌					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1563	-	-	-	-	-	-
781	-	-	-	-	-	-
391	-	-	-	-	-	-
195	-	-	-	-	-	-
98	-	-	-	-	8.1	5.0
49	9.0	8.5	8.5	-	8.4	7.9

(2) 上記シクロペンテノンの大腸菌及び腸管出血性大腸菌への抗菌作用を測定した。被検菌は下記のとおりである：

被検菌(7)：エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) (S-O157:H7、VT1、2産生株)、被検菌(8)：*Escherichia coli* (Y. 3-O157:H7、VT1、2産生株)、被検菌(9)：*Escherichia coli* (Y. 1-O157:H7、VT1産生株)、被検菌(10)：*Escherichia coli* (S-O26:HNM、VT1産生株)、被検菌(11)：*Escherichia coli* (S-O111;HNM、VT1、2産生株) 及び被検菌(12)：*Escherichia coli* (食品分離株) である。

使用した菌株はいずれも女子栄養大学・衛生学教室保存菌株である。

抗菌作用の測定は、実施例19-(1)と同様に行った。

まず、感受性測定ブイヨン(日水製)に一定濃度のシクロペンテノンを加え、 2° 連続希釈を行った。それに感受性測定ブイヨンで 37°C 16時間前培養を行った菌液を 10^6 /mlになるように接種し、 37°C で培養を行った。なお、菌株の各培養時間ごとの菌数の測定は、培養液を適宜希釈し表面塗抹培養法により行った。なお、菌株の菌数測定にあたってはDHL(栄研製)を使用した。測定した各培養時間での菌数は上記と同様に対数値で表示した。下記表12、表13にその結果を示す。シクロペンテノンはいずれの被検菌にも抗菌作用を示した。

表 1 2

被検菌培養液中 添加試料濃度 (ppm)	1 6 時間培養後の被検菌数 (CFU/ml)					
	被検菌					
	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
1563	-	-	-	-	-	3.0>
781	-	-	3.0>	-	-	6.4
391	3.6	3.3	3.0>	-	3.6	5.8
195	4.7	4.7	3.0>	-	6.2	6.6
98	7.0	7.0	7.1	6.1	7.4	8.3
49	6.3	6.9	7.1	7.1	8.0	8.2
0	8.5	8.0	8.6	8.5	8.5	8.5

表 1 3

被検菌培養液中 添加試料濃度 (ppm)	4 8 時間培養後の被検菌数 (CFU/ml)					
	被検菌					
	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
1563	-	-	-	-	-	-
781	-	-	-	-	-	-
391	-	-	-	-	-	-
195	-	-	-	-	4.1	-
98	8.9	5.3	8.6	7.4	8.5	5.0
49	8.5	9.3	8.5	9.8	8.5	10.1

(3) 被検菌として被検菌(13) : *Escherichia coli* HB101 (ATCC 33694)、被検菌(14) : *Salmonella typhimurium* LT-2 (ATCC 27106)、被検菌(15) : シュードモナス アエルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*) (IFO 3080)、被検菌(16) : *Staphylococcus aureus* 3A (NCTC 8319)、被検菌(17) : バチルス ズブチリス (*Bacillus subtilis*) (IFO 3034)、被検菌(18) : ストレプトコッカス ミュータンス (*Streptococcus mutans*) GS5 (国立予防衛生研究所保存株) を使用し、上記シクロペンテノンの抗菌活性を測定した。

被検菌をL-ブロス(1% トリプトン、0.5 %酵母エキス、5% NaCl pH 7.0)で、一晚種培養した。5ml のL-ブロスに25~200 μ g/mlのシクロペンテノンを添加した培地及び何も添加していない培地に5 μ lの種培養液を植菌し、37℃で振とう培養し生育を測定した。培養開始時と8時間後に、富士デジタル濁度計(販売元 富士工業株式会社、製造元 秋山電機製作所)を用い、調製目盛を82.3の条件で培養物の濁度を測定し、8時間後の濁度の値から培養開始時の濁度の値を引いた値(生育濁度)で被検菌の生育を測定した。なお被検菌(18)についてはL-ブロスの代りにブレイン ハート インヒュージョン培地を使用した。

結果を表14に示す。なお表14中の-は未検討を示す。

表 1 4

被検菌	生育濁度				
	シクロペンテノン添加量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ 培地)				
	0	25	50	100	200
(13)	2 2 2	0	0	0	0
(14)	2 7 3	—	—	0	0
(15)	2 3 9	2	0	0	0
(16)	2 4 3	2 0 3	1 5 8	0	0
(17)	2 6 7	1 4 5	9	0	0
(18)	1 4 0	1 3 3	1 3 0	3 4	6

上記各被検菌に対し、シクロペンテノンは抗菌活性を示した。

(4) シクロペンテノンの火落菌に対する抗菌活性を以下の方法で行った。被検菌を10% エタノールを含有するSI培地（日本醸造協会）で5日間静置培養し種菌を得た。10% エタノールを含有するSI培地に最終濃度が0、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにシクロペンテノンを添加した培地100 mlに被検菌の種菌を0.1%植菌し、5日間静置培養し、濁度を測定した。濁度の測定は、吸光度計を用い、OD600の値を測定した。この値から、被検菌を植菌していない培地のOD600の値を引いた値（生育濁度）で被検菌の生育を測定した。

被検菌は真性火落菌としてラクトバチルス フラクチボランス (*Lactobacillus fructivorans*) IF013118 (被検菌A)、*Lactobacillus fructivorans* JCM1198 (被検菌B)、ラクトバチルス ホモヒオチイ (*Lactobacillus homohiochii*) IF013120 (被検菌C)、火落性乳酸菌としてラクトバチルス ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) IF03532 (被検菌D) を用いた。その結果を表15に記載する。

表 1 5

被検菌	生育濁度			
	シクロペンテノン添加量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ 培地)			
	0	25	50	75
A	0.96	0.17	0.02	0
B	2.03	0.01	0	0
C	1.61	0.32	0.08	0
D	0.35	0.04	0.01	0

被検菌 A、C 及び D は $75\mu\text{g}/\text{ml}$ で、被検菌 B は $50\mu\text{g}/\text{ml}$ で完全に生育が阻止され、シクロペンテノンは火落菌にも抗菌作用を示した。

なおシクロペンテノンはサッカロミセス セレビシェ (*Saccharomyces cerevisiae*) ATCC 9763、カンジダ アルビカンス (*Candida albicans*) TIMM 0136、アスペルギルス フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) TIMM 1776 等の真菌にも高濃度下で抗菌活性を示した。

実施例 20

(1) 800、400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.13、又は $1.56\mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロペンテノンを含むトリプトソーヤブイオン培地 (日水社製) に *Vibrio parahaemolyticus* 4387-61 又は *Vibrio parahaemolyticus* T1111-1 (いずれも国立衛生試験所保存株) を 1×10^6 細胞/ml の濃度で接種した。

接種後、 37°C で 24 時間培養し、培養液を 10 倍希釈し、OD₆₀₀ を測定した。対しても 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のシクロペンテノン添加区分で菌の生育が見られなかった。

菌の生育が見られなかった区分の培養液 $50 \mu\text{l}$ を 20ml のシクロペンテノンを含まないトリプトソーヤブイヨン寒天培地に塗布し、 37°C で 24 時間培養した。その結果、どちらの菌株でも $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のシクロペンテノンを添加した区分を塗布した寒天培地で菌の生育が見られなかった。

以上より、シクロペンテノンは $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で *Vibrio parahaemolyticus* 4387-61 及び *Vibrio parahaemolyticus* T4144-1 に対して抗菌作用を、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ で両菌株に対して殺菌作用を示した。

(2) *Campylobacter jejuni* A3309 (国立衛生試験所保存株) を 2% 仔ウシ血清 (大日本製薬社製) を含む脳心臓滲出液 (ディフコ社製) 培地に接種し、 37°C で 16 時間、振とう前培養した。この培養液 $50 \mu\text{l}$ を 800 、 400 、 200 、 100 、 50 、 25 、 12.5 、 6.25 、 3.13 、又は $1.56 \mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロペンテノンを含む 20ml の 0.5% NaCl 含有ミューラー・ヒント平板培地 (BBL 社製) に塗布し、 37°C で 48 時間静置培養した。

その結果、 $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のシクロペンテノンを添加した平板培地上には菌の生育が見られなかった。

以上シクロペンテノンはキャンピロバクターに対して抗菌作用を示した。

(3) 被検菌① *Legionella pneumophila* (ヒト器官洗浄液分離菌)、被検菌② *Legionella pneumophila* (温泉浴槽水分離菌) (いずれも女子栄養大学・衛生学教室保存菌株) に対するシクロペンテノンの抗菌作用の測定を、各被検菌に対する増殖抑制効果を指標に行った。すなわち、一定濃度のシクロペンテノンを含む液体培地に各被検菌を一定量添加した試験菌液を調製し、 16hr 、 48hr 、 72hr 、 96hr 培養後の生菌数の検討を行った。

まず、BCYE α ブロス (オキシイド社製) に、一定濃度のシクロペンテノンを加え、 2° 連続希釈を行った。それに BCYE α ブロスで 37°C 16 時間前培養を行った菌液を $10^6/\text{ml}$ になるように接種し、 37°C で培養を行った。各菌株の各培養時間ごとの生菌数の測定は、培養液を適宜希釈し、BCYE α 寒天 (オキシイド社製) への表面塗抹培養法により行った。

各培養時間での測定した菌数は、CFU (colony forming units) / ml として常用対数値で表示した。下記表 16 にその結果を示す。シクロペンテノンはいずれの被検菌にも抗菌作用を示した。なお表中の－記号は、被検菌の生育が見られなかったことを意味する。

表 16

被検菌培養液中 添加試料濃度 (ppm)	各培養後の被検菌数 (CFU/ml)			
	16時間 被検菌		96時間 被検菌	
	①	②	①	②
24	—	—	—	—
12	5.7	6.1	8.3	8.6
0	6.9	7.4	8.7	8.6

(4) *Helicobacter pylori* 菌株は標準株 NCTC 11637 (ATCC 43504)、それにヒト胃よりの臨床分離株 206 及び 3401 (いずれも兵庫医大・細菌学教室保存株) を用いた。それぞれの菌株は、7%馬血清 (Bio Whittaker 社製) 入りの *Brucella Broth* 培地 (BBL 社製) を用い、アネロパックキャンピロ (三菱ガス化学製) を用いて、微好気条件下で、37℃で振とう培養した。対数増殖期の菌を *Brucella Broth* 培地に接種し、24時間培養後、試験に用いた。試験には、0.1 ml の培養液を、0.9 ml の

を分注し、PBS で 2 段階希釈を行った後、ウェル当り 0.1 ml の培地 (7%馬血清入りの *Brucella Agar* 培地 (pH 6.0) (BBL 社製))

を加え固めた。Brucella Agar 培地は、あらかじめ塩酸で pH 6.0 に調整したものを使用した。それぞれの菌を約 10^4 個 / $50 \mu\text{l}$ / ウエルで接種した。菌の接種後、微好気条件下で 3—4 日間 37°C で培養し、抗菌活性を判定した。90%以上の増殖を阻害するサンプルの量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を、MIC とした。その結果、試験したどの菌株に対しても MIC は $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、シクロペンテノン はヘリコバクター 菌株に抗菌作用を示した。

実施例 21

シクロペンテノンの固形がんに対する制がん作用

実施例 3—(1) 記載のシクロペンテノンを生理的食塩水で所定の濃度に希釈し、以下の試験を行った。

(1) Meth A 細胞 (2×10^6 細胞 / マウス) を 8 週齢の雌性 BALB/c マウス (体重約 20 g) の腹部に皮下注射した。その後、引き続いて同じ箇所に 5 日間連続してシクロペンテノン ($5 \text{ mg}/\text{kg}/\text{日}$) を皮下注射した。一方コントロール群には生理的食塩水を同様に皮下注射した。2 週間後にマウス腹部に形成されたがん組織を摘出して、その重量を測定した。結果を表 17 に示す。

すなわち、コントロール群では平均がん重量は 1.41 g であったのに対し、シクロペンテノン ($5 \text{ mg}/\text{kg}/\text{日}$) 投与群では 0.00 g でがん組織の形成は全く認められず、抑制率は 100% であった。

表 17

マウス	(n)	腫瘍重量 (g) 平均 \pm SD	抑制率 (%)
コントロール	(7)	1.41 \pm 0.55	—
シクロペンテ ノン投与	(8)	0.00 \pm 0.00	100.0

(2) 6週齢の雌性ICR系マウス(体重約26g)16匹を用い、Sarcoma-180(5.5×10^6 cells/マウス)を腹部に皮下注射し、コントロール群8匹及びシクロペンテノン投与群8匹を設定した。

シクロペンテノン投与群には、シクロペンテノンとしての摂取量が約80mg/kg/日となるよう水道水に希釈し、給水瓶にて自由摂取させた。コントロール群には同様に水道水を与えた。餌は両群とも実験期間中、自由摂食とした。

Sarcoma-180皮下移植後40日目の生存個体数はコントロール群で8例中2例、シクロペンテノン投与群で7例で、シクロペンテノン投与による顕著な延命効果が認められた。

(3) マウス白血病P-388(1.1×10^6 cells/マウス)を7週齢の雌性DBA/2マウス(体重約20g)に腹腔内注射した。その後、5日間連続してシクロペンテノン(10mg/kg/日)を腹腔内注射した。一方コントロール群には生理的食塩水を同様に腹腔内注射した。それぞれ8匹ずつの2群において、マウスの生存数、平均生存日数、延命率を算定した。結果を図15に示した。すなわち、コントロール群では平均生存日数が10.3日であったのに対し、シクロペンテノン投与群では31.4日で、その延命率は306.1%を示し、有意な延命効果が認められた。図15はシクロペンテノンの制がん効果を示す図であり、縦軸は生存数、横軸は生存日数を示す。図15中実線がシクロペンテノン投与群、破線は対照群を示す。

同様に、5週齢の雌性ICR系マウス(体重約25g)16匹を用い、Sarcoma-180(5.5×10^6 cells/マウス)を腹腔内注射し、コントロール群8匹及びシクロペンテノン投与群8匹を設定した。

また7週齢の雌性CDF1マウス(体重約20g)16匹を用い、IMC(2.0×10^6 cells/マウス)を腹腔内注射し、コントロール群8匹及びシクロペンテノン投与群8匹を設定した。

シクロペンテノン投与群には、シクロペンテノンとしての摂取量が約80mg/kg/日となるよう水道水に希釈し、給水瓶にて自由摂取させた。コントロール群には同様に水道水を与えた。餌は両群とも実験期間中、自由摂食とした。

その結果、S a r c o m a - 1 8 0、I M C、E A Cの各コントロール群の平均生存日数はそれぞれ22.6日、10.8日及び15.8日であったのに対し、シクロペンテノン投与群ではそれぞれ33.4日、20.3日及び40.3日であった。各々の延命率は148%、188%及び255%であり、シクロペンテノン投与によりいずれも顕著な延命効果が見られた。

実施例 22

注射剤

(1) 生理食塩液（日本薬局法収載品）にシクロペンテノンを1%濃度で加え注射剤を作製した。

(2) 生理食塩水（前記と同じ）にシクロペンテノン及びグリシルリチン酸をそれぞれ0.5%及び0.1%濃度で加え、注射剤を作製した。

実施例 23

錠剤

(1) シクロペンテノン100mgと微結晶性セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

(2) シクロペンテノン0.1mg、グリシルリチン酸ジカリウム10mg及び微結晶セルロースの適量を含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

実施例 24

軟膏

下記組成で軟膏を作成した。

シクロペンテノン	1 g
吸水軟膏（日本薬局方収載）	99 g

シクロペンテノンをまず少量の吸水軟膏と十分に練り合せ、次いで残った吸水軟膏を徐々に加えて均一になるまで練り合せて軟膏を作製した。

この軟膏は1日4～5回患部に塗布される。

実施例 25

化粧品

下記組成で抗菌性化粧料としてローションを作製した。

エタノール	10部
グリセリン	1部
クエン酸	0.3部
パラオキシ安息香酸メチル	0.2部
シクロペンテノン	0.1部
香料	微量
精製水	全量を100部とする量

実施例 26

浴用剤

下記組成で抗菌性浴用剤を作製した。

無水ボウ硝	20部
炭酸水素ナトリウム	40部
コハク酸	10部
シクロペンテノン	30部
色素	適量
香料	適量
剤形	錠剤

実施例 27

歯磨剤

下記組成で歯磨剤を調製した。

炭酸カルシウム	50.00%
グリセリン	20.00%
カラゲナン	0.50%

ショ糖モノラウレート	2.00%
香料	1.00%

サッカリン	0. 1 0 %
シクロペンテノン	0. 1 0 %
水	残
計	1 0 0. 0 0 %

実施例 28

下記組成で錠菓を調製した。

砂糖	7 4. 9 %
乳糖	2 0. 0 %
ショ糖モノラウレート	0. 2 %
香料	0. 5 %
精製水	4. 3 %
シクロペンテノン	0. 0 0 1 %

実施例 29

下記方法で抗菌性飲料を作製した。

(1) ペクチン (ポモシンペクチン LM-13CG : ハーキュリーズ社製) 5 kg を水道水 100 リットルに添加し、液温 28℃ から液温 120℃ となるまで水蒸気吹込みにより 35 分間昇温させ、次いで攪拌下で 120℃、5 時間保温し、次いで冷却し、冷却物 135 リットルを調製した。次いで冷却物にろ過助剤として、セライト #545 (セライト社製) 1.35 kg、及びシリカ #600-S (中央シリカ社製) 1.35 kg を添加し、次いでセライト #545 の 0.1 kg、及びシリカ #600-S の 0.1 kg でプレコートしたコンパクトフィルター (6 インチ 16 段ろ紙 : ADVANTEC #327) でろ過を行った。得られたろ液はプレートヒーター (日阪製作所製) による連続瞬間加熱処理 (98℃、60 秒) を行った後冷却し、150 リットルのシクロペンテノン含有のペクチン加熱処理液を調製した。

シクロペンテノン含有のペクチン加熱処理液の pH は約 3.5、酸度は 6.2 ml、糖度は 5.8 Brix % であった。なお pH は pH メーターで測定し、酸度は試料 10 ml を pH 7.0 に中和するのに要する 0.1 N NaOH 量 (m

1) で表示した。更に糖度はブリックス糖度計で測定した。

(2) 緑茶葉 10 g、ビタミンC 0.2 g 及びイオン交換水 1000 ml を用い、常法に従って緑茶を調製した。本発明品 1 は、上記シクロペンテノン含有ペクチン加熱処理液を用い、製品 100 ml 当り固形物換算で 200 mg (シクロペンテノン 1.6 mg 含有) を添加した。対照は、無添加のものとした。パネラー 20 名で、5 段階 (5 良、1 悪) の官能評価を行い、その結果の平均値を表 18 に示した。

表 18 官能評価

	本発明品 1	対照
味の幅	4.3	3.2
味のバランス	3.9	3.4
味の総合	4.3	3.3

表 18 より、本発明品 1 は対照に比べて、味の幅と広がりが増し、味とのバランスが整い、茶の香味が引立ち、隠し味の効果が出ているとの評価であった。

実施例 30

下記組成で飲料を調製した。

果糖ブドウ糖液糖	5.00%
砂糖	4.00%
酸味料	1.20%
香料	0.20%
精製水	残
計	100.00

なおシクロペンテノン含有物としては実施例 29 - (1) 記載のシクロペンテノン含有ペクチン加熱処理液を使用し、その固形物換算量を添加した。この飲料 100 ml 中には 4 mg のシクロペンテノンが含有されている。

実施例 31

新鮮なキャベツ 200 g を短冊切りし、水（対照）、0.2% のシクロペンテノン水溶液に各 100 g ずつ、5 分間浸漬した。その後、軽く水切りし、合成樹脂製袋に入れ室温（20℃）で放置した。24 時間後の観察において、シクロペンテノン水溶液に浸漬したものは、水（対照）に浸漬したものに比べ、新鮮度が保持された。

これは日数の増加と共に、差が明確となり、4 日後の観察ではシクロペンテノン水溶液に浸漬したものは、水（対照）に浸漬したものに比べ、異臭はなく、新鮮度が保持されていた。

発明の効果

本発明により制がん作用、がん細胞増殖抑制作用、がん細胞分化誘導作用、アポトーシス誘発作用、抗菌作用等の生理活性を有する安全性の高いシクロペンテノン及びその光学活性体が提供され、かつ、該化合物を含有する生理活性機能を有する医薬品、食品及び飲料が提供される。本発明により、シクロペンテノンは天然由来の原料から簡便に、効率良く製造することが可能となり、その光学活性体の安価な提供も可能となった。

本発明により提供されるシクロペンテノン及び／又はその光学活性体は、その生理活性によって、発がん予防、がん抑制効果、抗菌効果を有する医薬品として使用することが可能となり、該医薬品は生体の恒常性の維持、特に胃腸健康保持に有用な医薬品となる。またシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を有効成分とする防腐剤、抗菌性化粧料、抗菌性歯磨剤、抗菌性浴用剤が提供される。

本発明により、食品又は飲料中に生理活性を有するシクロペンテノン及び／又はその光学活性体の適量含有させることが可能となった。このシクロペンテノン及びその光学活性体が有する種々の生理活性によって、本発明の食品又は飲料は発がん予防、制がん効果、抗菌効果、アポトーシス誘発作用等の生体の恒常性

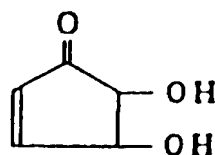
(ホメオスタシス) 維持機能を有する健康食品又は飲料であり、本発明により、胃腸健康保持に有用な機能性物質入りの食品又は飲料が提供される。また、シクロペンテノン添加することにより、食品又は飲料の抗菌力を簡便に増強することができ、シクロペンテノン及び／又はその光学活性体を含有する製剤は食品又は飲料の防腐剤としても極めて有用である。

また本発明によりウロン酸、ウロン酸誘導体、シクロペンテノンの生成中間体又はシクロペンテノンと反応性を有するアミン類、アミノ酸類、ペプチド類又は蛋白質の反応性の少なくとも一部が消失した及び／又は該反応性物質の少なくとも一部が除去されたウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物が提供され、該ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物を使用することにより効率よく本発明に使用するシクロペンテノン及び／又はその光学活性体を製造することができる。該ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物としてはウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物の乾式加熱処理物がある。乾式加熱処理としては焙炒処理が簡便であり、焙炒植物、焙炒動物、焙炒微生物、例えば焙炒野菜、焙炒果実、焙炒穀物、焙炒きのこ、焙炒海藻、焙炒皮質、焙炒軟骨等は本発明のシクロペンテノン及び／又はその光学活性体の製造において極めて有用である。なお乾式加熱処理の前に被処理物の脱水処理を行うことにより効率よく乾式加熱処理物を調製することができる。

請 求 の 範 囲

1. 下記 (a)、(b)、(c) より選択される少なくとも1種の物を加熱処理することを特徴とする下記式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

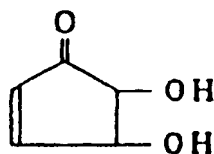
- (a) ウロン酸又はウロン酸誘導体、
- (b) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、
- (c) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。



【1】

2. 下記 (a)、(b)、(c) より選択される少なくとも1種の物を加熱処理し、次いで該加熱処理物より式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを採取することを特徴とする4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

- (a) ウロン酸又はウロン酸誘導体、
- (b) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、
- (c) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。



【1】

3. ウロン酸がガラクトロン酸、グルクロン酸、グルロン酸、マンヌロン酸及び／又はイズロン酸である請求の範囲1又は2記載の4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

4. ウロン酸誘導体が、ウロン酸の塩、あるいはウロン酸ラクトン、ウロン酸

エステル、ウロン酸アミド又はそれらの塩である請求の範囲 1 又は 2 記載の 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

5. 糖化合物がペクチン、ペクチン酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、フコイダン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸及び／又はその分解物から選択される糖化合物である請求の範囲 1 又は 2 記載の 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

6. 加熱処理物が 60～350℃、数秒～数日加熱処理して得られる請求の範囲 1～5 のいずれか 1 項に記載の 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

7. 加熱処理物が酸性～中性の条件下で加熱処理を行って得られる請求の範囲 1～6 のいずれか 1 項に記載の 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの製造方法。

8. 下記工程を包含することを特徴とする 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの光学活性体の製造方法。

(A) : (a)、(b)、(c) より選択される少なくとも 1 種の物を加熱処理し、4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを生成させる工程、

(a) ウロン酸又はウロン酸誘導体、

(b) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、

(c) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物、

(B) : 必要に応じて、得られた加熱処理物より 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを単離する工程、

(C) : 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを光学分割する工程。

ロペンテン-1-オンの光学活性体の製造方法。

10. ウロン酸誘導体が、ウロン酸の塩、あるいはウロン酸ラクトン、ウロン酸

エステル、ウロン酸アミド又はそれらの塩である請求の範囲 8 記載の 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの光学活性体の製造方法。

11. 糖化合物がペクチン、ペクチン酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、フコイダン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸及び／又はその分解物から選択される糖化合物である請求の範囲 8 記載の 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの光学活性体の製造方法。

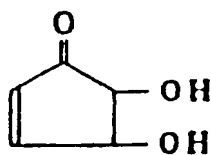
12. 加熱処理物が 60～350℃、数秒～数日加熱処理して得られる請求の範囲 8～11 のいずれか 1 項に記載の 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの光学活性体の製造方法。

13. 加熱処理物が酸性～中性の条件下で加熱処理を行って得られる請求の範囲 8～12 のいずれか 1 項に記載の 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの光学活性体の製造方法。

14. 旋光度が $[\alpha]_D^{20} - 105^\circ$ (± 0.30 , エタノール) である (－) 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン。

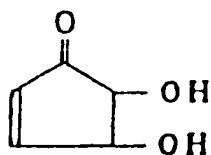
15. 旋光度が $[\alpha]_D^{20} + 104^\circ$ (± 0.53 , エタノール) である (+) 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン。

16. 式【1】で表される 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び／又はその光学活性体を含有することを特徴とする制がん剤。



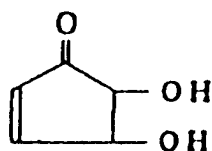
【1】

17. 式【1】で表される 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び／又はその光学活性体を含有することを特徴とするがん細胞分化誘導剤。



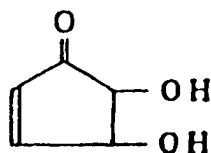
【1】

18. 式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び／又はその光学活性体を含むことを特徴とするアポトーシス誘発剤。



【1】

19. 式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び／又はその光学活性体を含むことを特徴とする抗菌剤。



【1】

- 20. 請求の範囲19記載の抗菌剤を有効成分とする防腐剤。
- 21. 請求の範囲19記載の抗菌剤を有効成分とする歯磨剤。
- 22. 請求の範囲19記載の抗菌剤を有効成分とする化粧品。
- 23. 請求の範囲19記載の抗菌剤を有効成分とする浴用剤。
- 24. 請求の範囲1記載の製造方法で得られる式【1】で表される4, 5-ジヒ

請求の範囲

記載の範囲

25. 請求の範囲1記載の加熱処理物を有効成分として含むことを特徴とする請求の範囲16～23いずれか1項に記載の剤。

26. 請求の範囲 2 記載の製造方法で採取される式【1】で表される 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを有効成分として含有することを特徴とする請求の範囲 16~23 いずれか 1 項に記載の剤。

27. 式【1】で表される 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び／又はその光学活性体を有効成分として使用することを特徴とするがん細胞分化誘導方法。



28. 式【1】で表される 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び／又はその光学活性体を有効成分として使用することを特徴とするアポトーシス誘発方法。



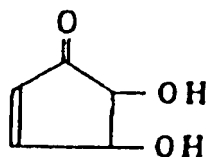
29. 請求の範囲 1 記載の製造方法で得られる式【1】で表される 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを有効成分として使用することを特徴とする請求の範囲 27 又は 28 記載の方法。

30. 請求の範囲 1 記載の加熱処理物を有効成分として使用することを特徴とする請求の範囲 27 又は 28 に記載の方法。

31. 請求の範囲 2 記載の製造方法で採取される式【1】で表される 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを有効成分として使用することを特徴とする請求の範囲 27 又は 28 に記載の方法。

32. 式【1】で表される 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オ

ン及び／又はその光学活性体を含有、希釈及び／又は添加してなることを特徴とする食品又は飲料。



【 1 】

33. 請求の範囲 1 記載の製造方法で得られる式【 1 】で表される 4, 5-ジヒドロキシー 2-シクロペンテン-1-オンを含有、希釈及び／又は添加してなることを特徴とする請求の範囲 3 2 記載の食品又は飲料。

34. 請求の範囲 1 記載の加熱処理物を含有、希釈及び／又は添加してなることを特徴とする請求の範囲 3 2 記載の食品又は飲料。

35. 請求の範囲 2 記載の製造方法で採取される式【 1 】で表される 4, 5-ジヒドロキシー 2-シクロペンテン-1-オンを含有、希釈及び／又は添加してなることを特徴とする請求の範囲 3 2 記載の食品又は飲料。

36. 式【 1 】で表される 4, 5-ジヒドロキシー 2-シクロペンテン-1-オン及び／又はその光学活性体を 100 重量部当り 5×10^{-6} 重量部以上含有することを特徴とする請求の範囲 3 2 ～ 3 5 いずれか 1 項に記載の食品又は飲料。

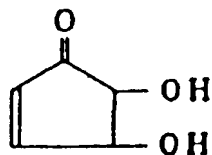
37. 制がん性食品又は制がん性飲料である請求の範囲 3 2 ～ 3 6 いずれか 1 項に記載の食品又は飲料。

38. 抗菌性食品又は抗菌性飲料である請求の範囲 3 2 ～ 3 6 いずれか 1 項に記載の食品又は飲料。

39. ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物中のウロン酸、ウロン酸誘導体、式【 1 】で表される 4, 5-ジヒドロキシー 2-シクロペ

チド類又は蛋白質の反応性の少なくとも一部が消失した及び／又は該反応性物質の少なくとも一部が除去されたものであるウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を

含有する糖化合物含有物。



【1】

40. 乾式加熱処理されて、ウロン酸、ウロン酸誘導体、式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの生成中間体、又は式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンと反応性を有するアミン類、アミノ酸類、ペプチド類又は蛋白質の反応性の少なくとも一部が消失した及び／又は該反応性物質の少なくとも一部が除去されたものである請求の範囲39記載のウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。

41. 乾式加熱処理が、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物を60～400℃の熱風で数秒から数日の焙炒処理を行うものである請求の範囲40記載のウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。

42. ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物が焙炒植物、焙炒動物又は焙炒微生物から選択される請求の範囲41記載のウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。

43. ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物が焙炒野菜、焙炒果物、焙炒穀物、焙炒きのこ、焙炒海藻、焙炒皮質又は焙炒軟骨から選択される請求の範囲42記載のウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。

44. 蛋白分解酵素処理されて、ウロン酸、ウロン酸誘導体、式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの生成中間体、又は式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンと反応性を有するアミン類、アミノ酸類、ペプチド類又は蛋白質の反応性の少なくとも

一部が消失した及び／又は該反応性物質の少なくとも一部が除去されたものである請求の範囲 39 記載のウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。

図 1

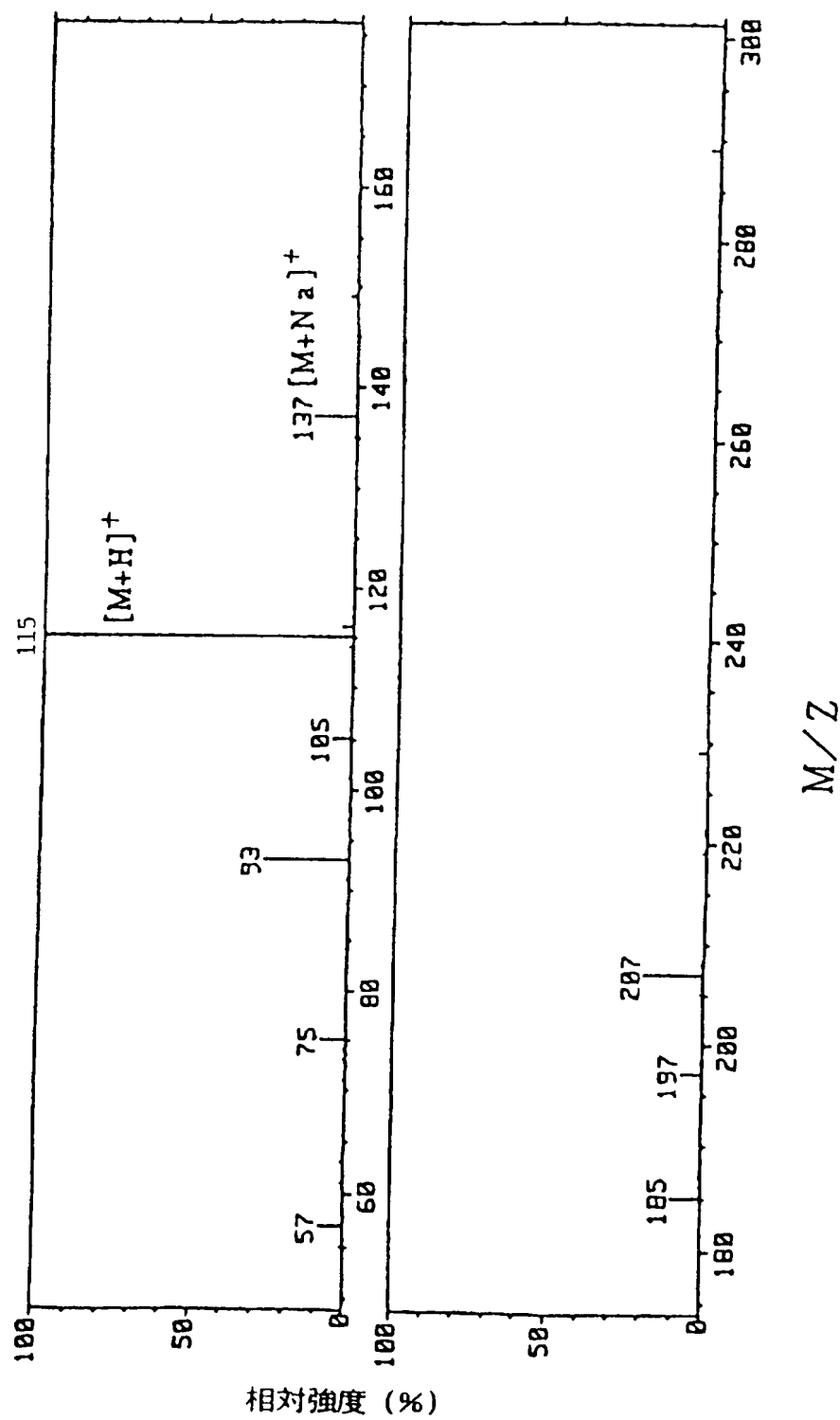


図 2

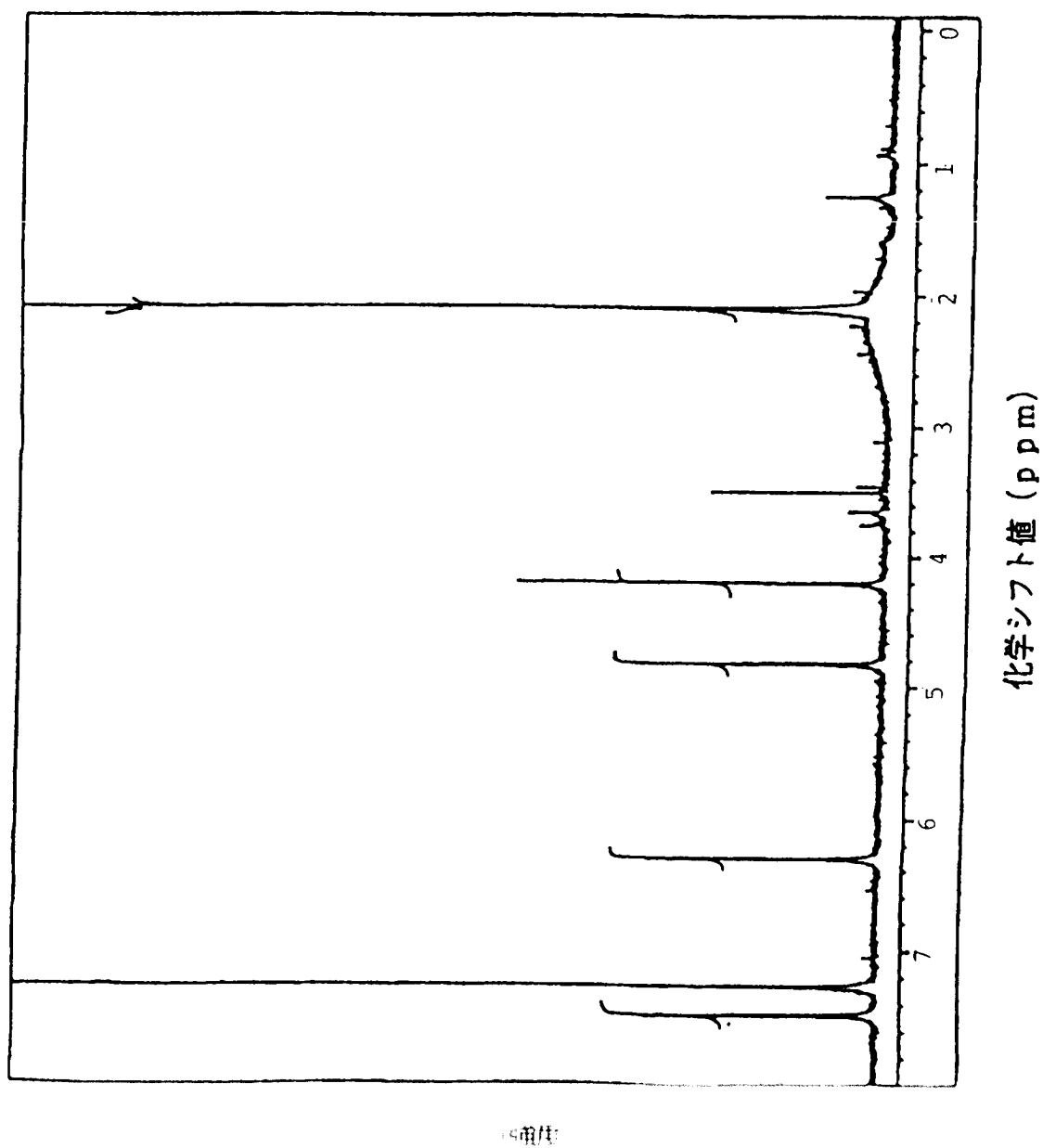


図 3

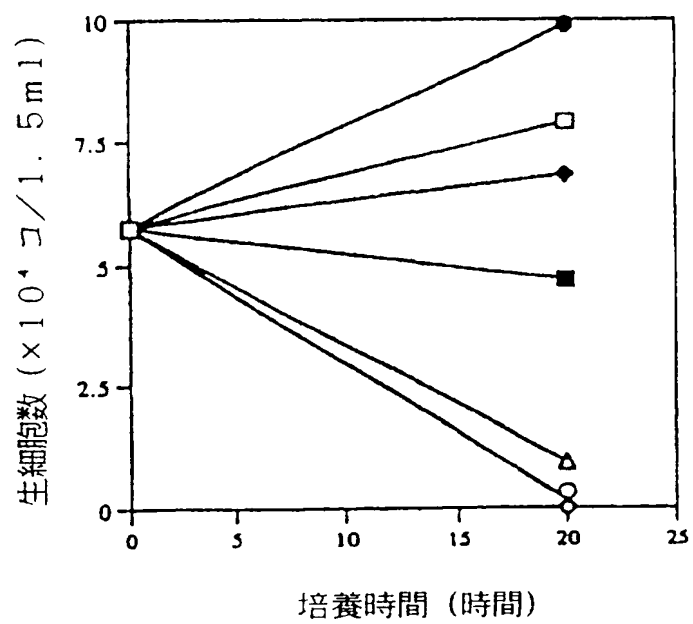


図 4

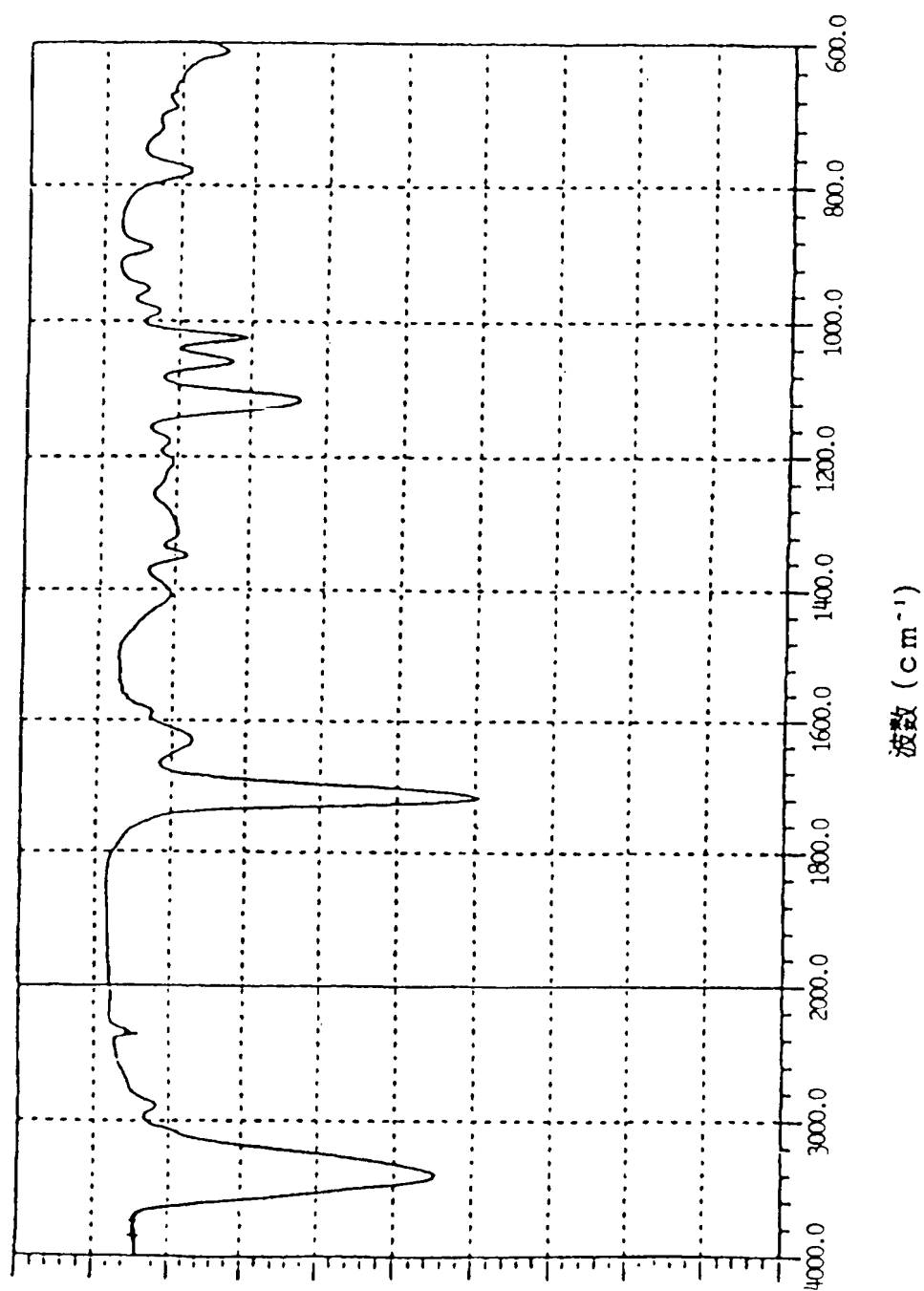


図 4 (b)

4/15

図 5

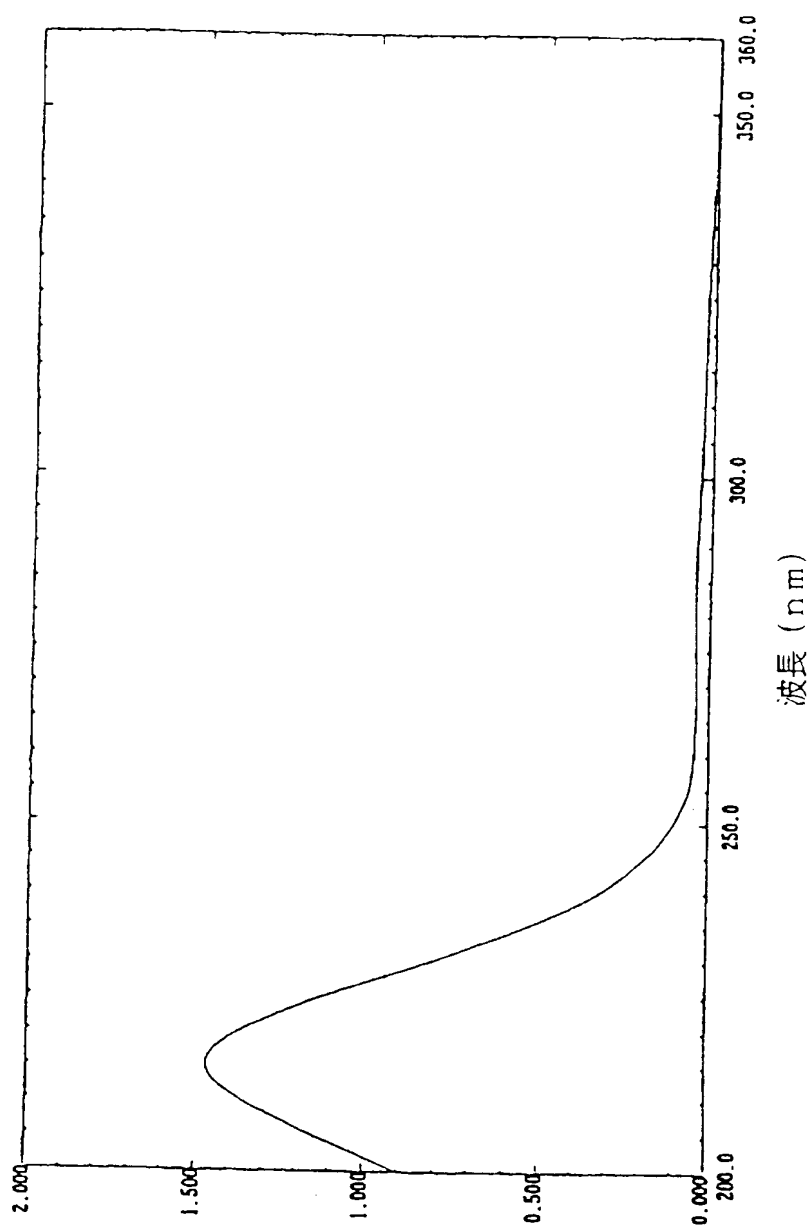


图 6

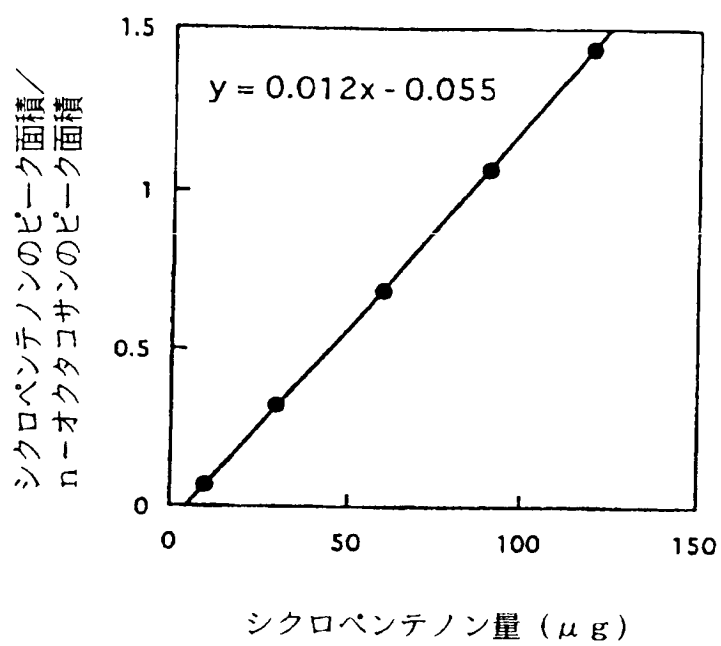


図 7

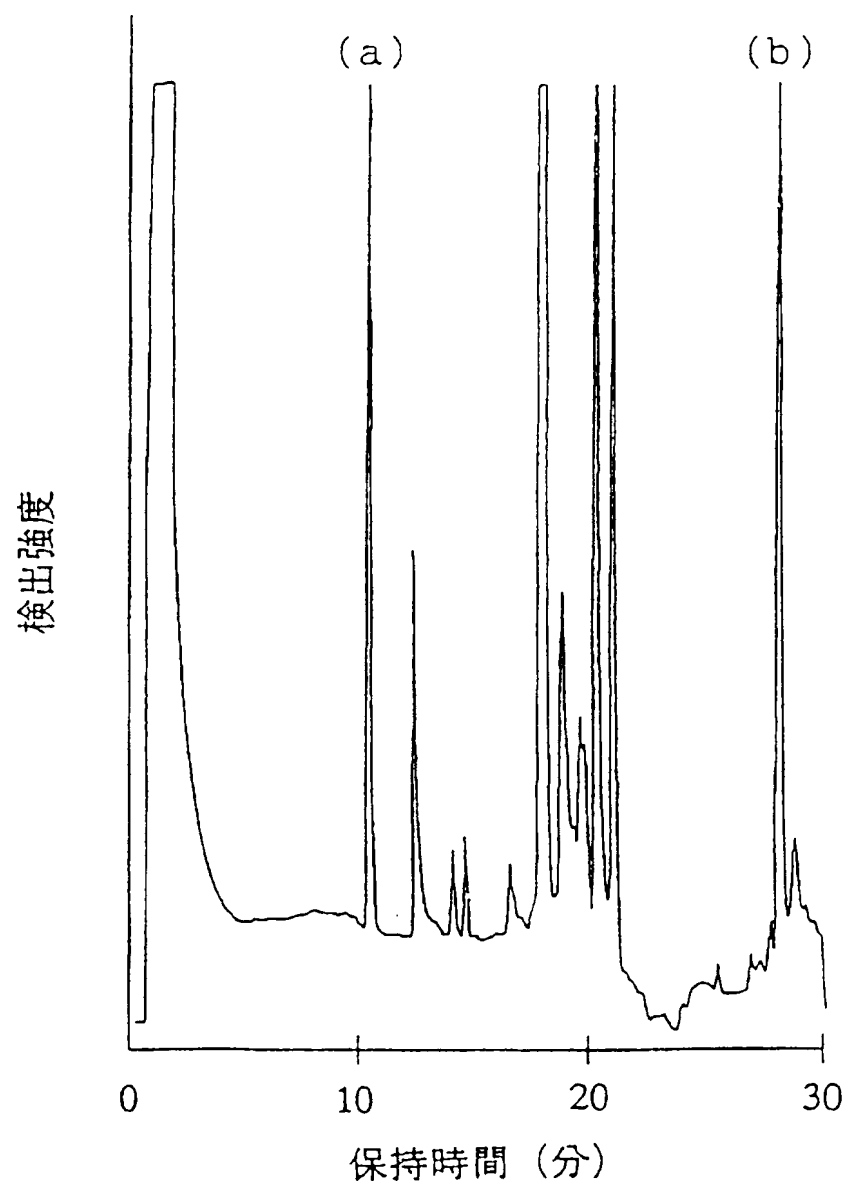


図 8

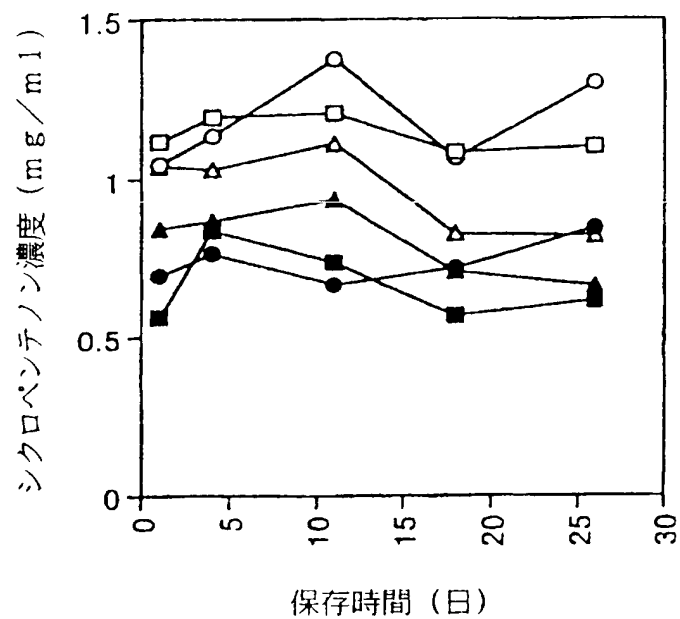


図 9

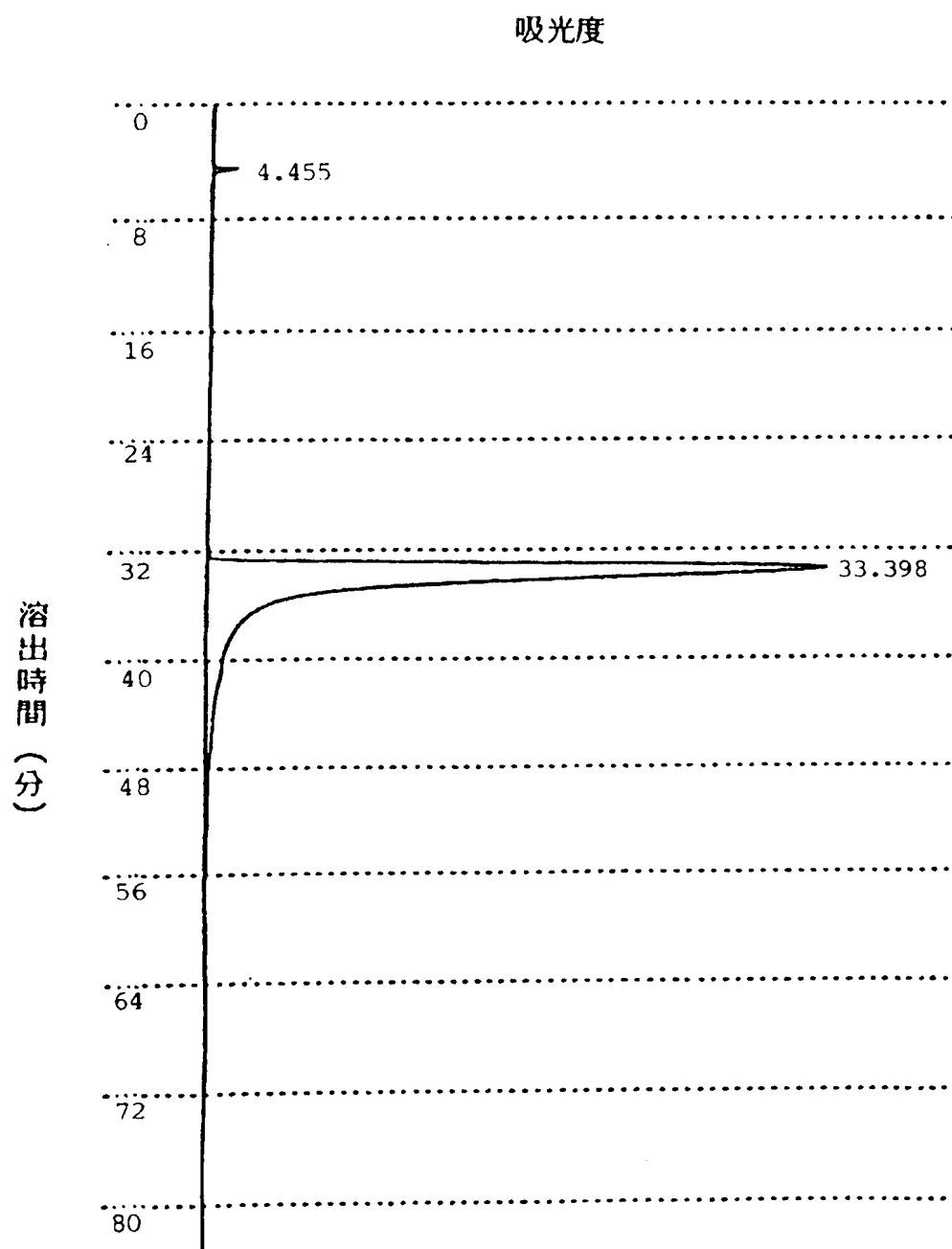


図 1 O

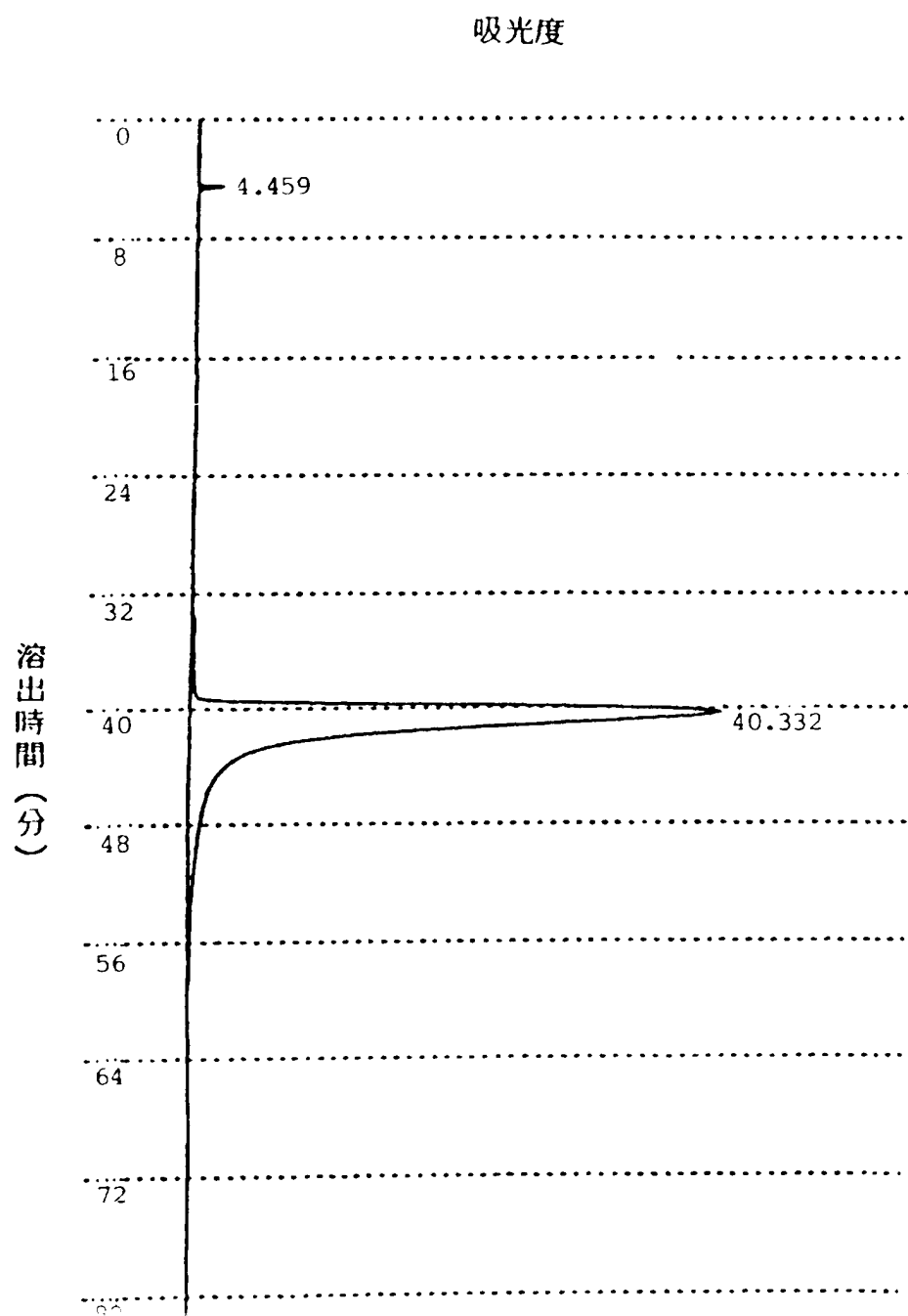
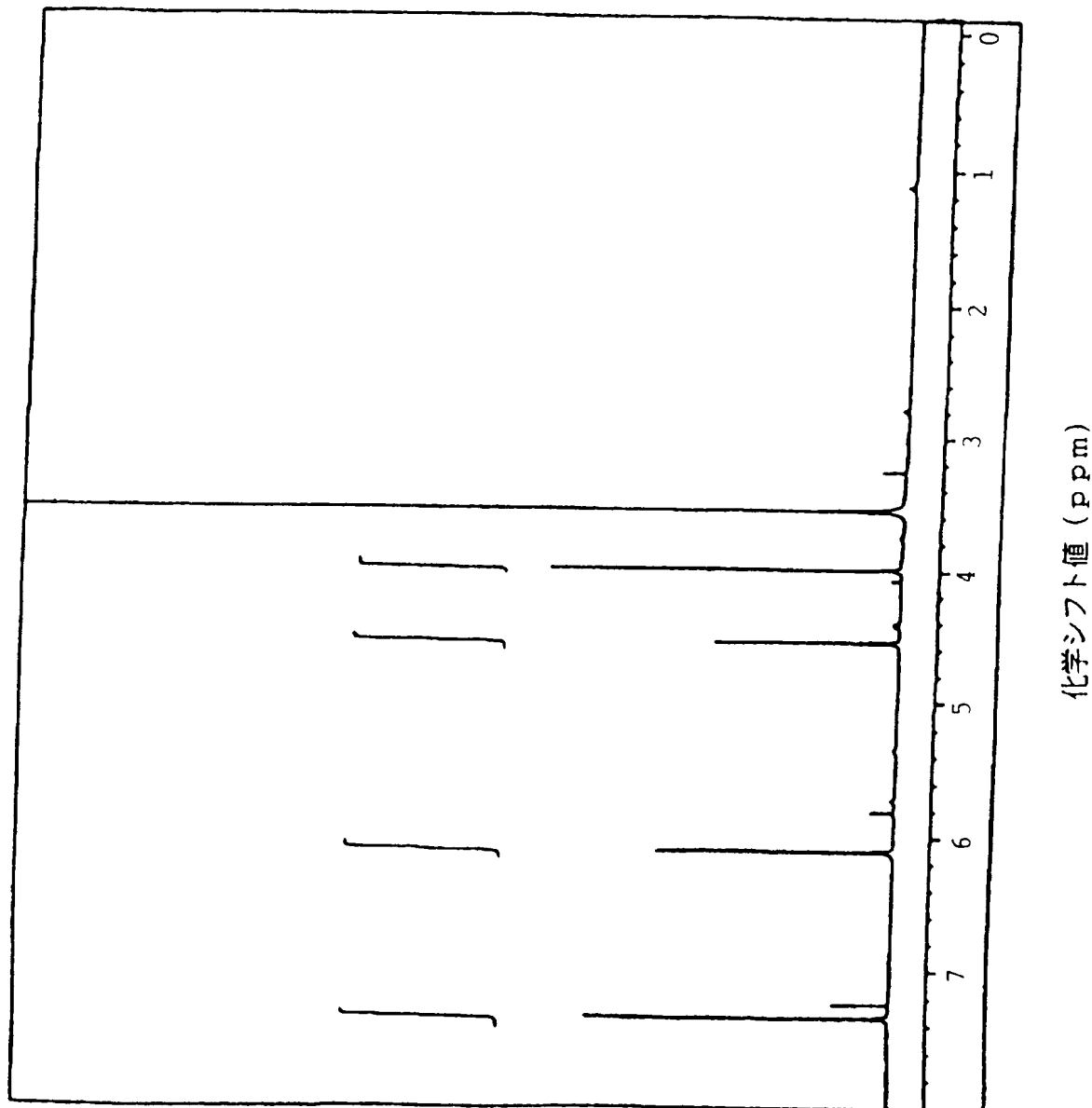


図 1 1



[図] 1 2

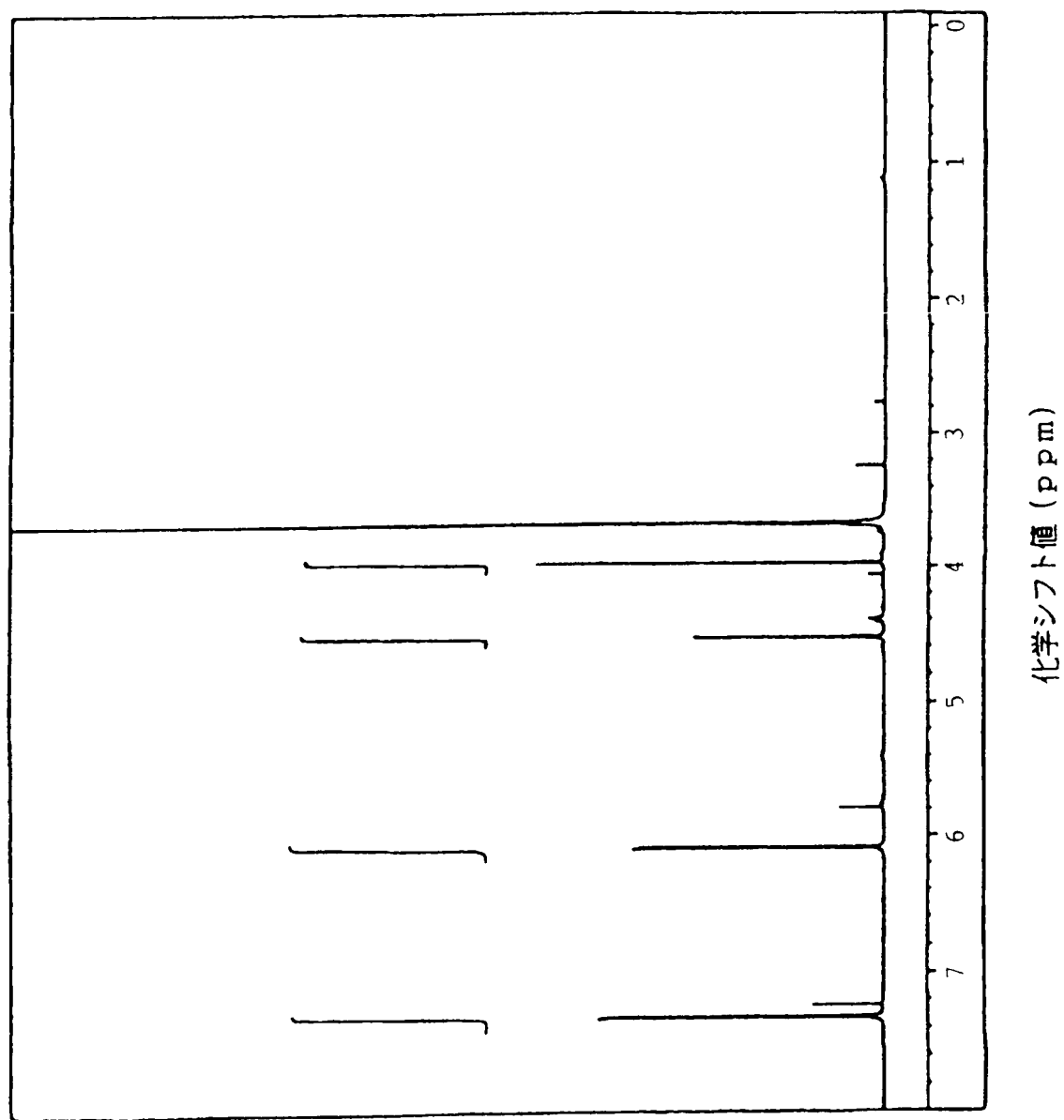
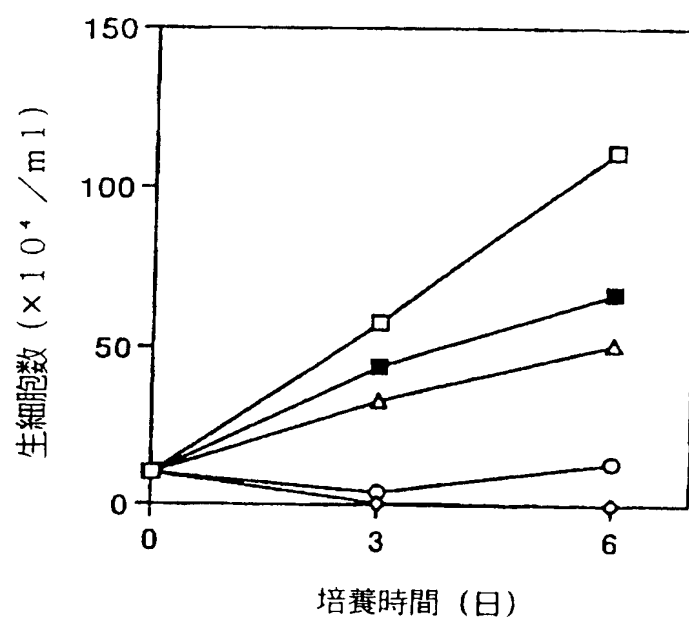


図 13



[図] 1 4

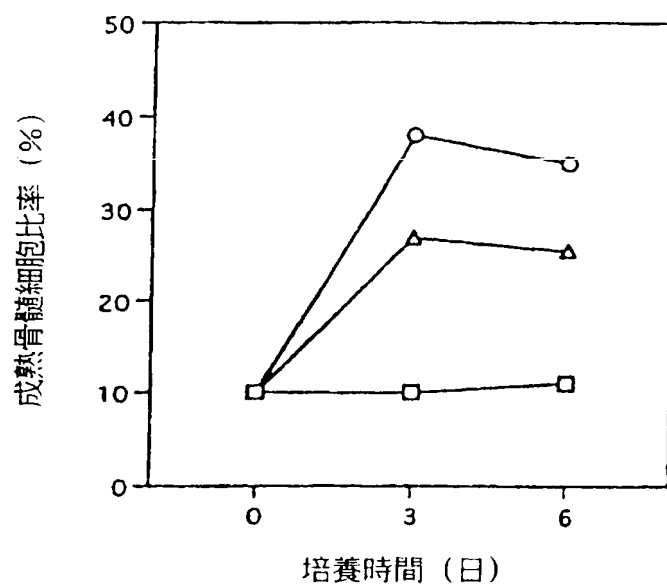
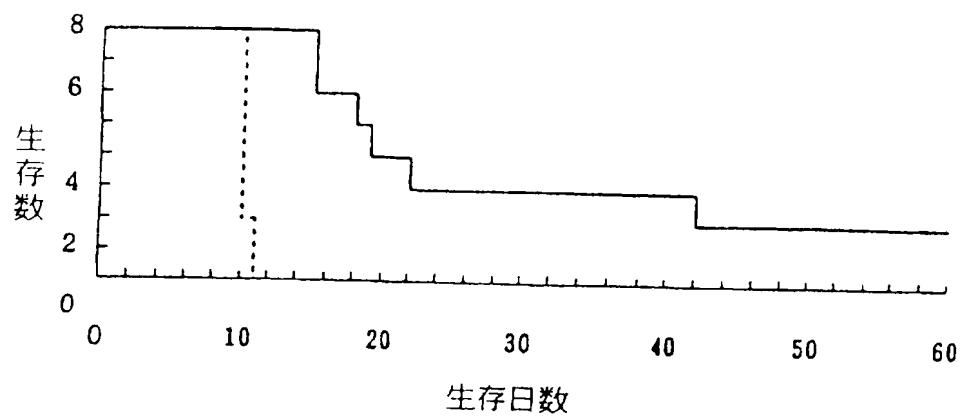


図 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07C49/707, C07C45/67, A01N35/06, A23L1/30, A61K7/00, A61K7/50, A61K31/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07C49/707, C07C45/67, A01N35/06, A23L1/30, A61K7/00, A61K7/50, A61K31/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS, REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Ahmad, Tania; Andersson, Rolf; Olsson, Kjell;	14 - 15
Y	Westerlund, Eric	1 - 13
A	"The formation of reductic acid from pentoses or hexuronic acids" Carbohydr. Res. (1993), 247, p. 217-222	16 - 44
X	Cocu, F.G.; Posternak, Th.	14 - 15
Y	"Cyclitols. XLIV. Synthesis of cycloses derived from cyclopentane"	1 - 13
A	Helv. Chim. Acta (1972), 55(8), p. 2838-2844	16 - 44
Y	Langenfeld, Norbert; Welzel, Peter	1-13, 39-44
A	"D-Moenuronic acid (4-methyl-D-glucuronic acid), a new building block for the antibiotic moenomycin A" Tetrahedron Lett. (1978), (21), p. 1833-1836	14 - 38
Y	JP, 2-247151, A (The Noguchi Institute),	1-13, 39-44
A	October 2, 1990 (02. 10. 90) (Family: none)	14 - 38

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Date of the actual completion of the international search

November 14, 1997 (14. 11. 97)

Date of mailing of the international search report

December 2, 1997 (02. 12. 97)

Name of the mailing address in the ISA

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03052

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 1-233255, A (The Noguchi Institute), September 19, 1989 (19. 09. 89) (Family: none)	1 - 44

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. * C07C49/707, C07C45/67, A01N35/06, A23L1/30, A61K7/00, A61K7/50, A61K31/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. * C07C49/707, C07C45/67, A01N35/06, A23L1/30, A61K7/00, A61K7/50, A61K31/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS. REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー *	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Ahmad, Tania; Andersson, Rolf; Olsson, Kjell; Westerlund, Eric	14-15
Y	"The formation of reductic acid from pentoses or hexuronic acids"	1-13
A	Carbohydr. Res. (1993), 247, p. 217-222	16-44
X	Cocu, F. G.; Posternak, Th.	14-15
Y	"Cyclitols. XLIV. Synthesis of cycloses derived from cyclopentane"	1-13
A	Helv. Chim. Acta (1972), 55(8), p. 2838-2844	16-44
Y	Langenfeld, Norbert; Welzel, Peter	1-13, 39-44
A	"D-Moenuronic acid (4-methyl-D-glucuronic acid), a new building block for the antibiotic moenomycin A"	14-38
	Tetrahedron Lett. (1978), (21), p. 1833-1836	

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「T」国際出願日前に、本発明の主張の基礎となる中継

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「Z」同一パテントファミリー文献

国際調査機関の名称及び国名

日本国特許庁 (J S A) (J P)

郵便番号 100

〒100 日本国特許庁

特許庁審査官 (権限のある職員)

本 業 務 司

4 H 9 4 9

印

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の
カテゴリー*

引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示

関連する
請求の範囲の番号

Y

A

A

JP, 2-247151, A (財団法人野口研究所)
2. 10月, 1990(02. 10. 90) (ファミリーなし)JP, 1-233255, A (財団法人野口研究所)
19. 9月, 1989(19. 09. 89) (ファミリーなし)1-13, 39-44
14-38

1-44